

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana Podolski-Renić

**USPOSTAVLJANJE REZISTENTNIH
TUMORSKIH ĆELIJSKIH LINIJA KAO
MODELA ZA TESTIRANJE NOVIH
HEMIOTERAPEUTIKA:
MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
REZISTENCIJE NASTALE
DUGOTRAJNIM IZLAGANJEM
PAKLITAKSELU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana Podolski-Renić

**THE ESTABLISHING OF RESISTANT
CANCER CELL LINES AS A MODEL
FOR TESTING OF NEW
CHEMOTHERAPEUTICS: MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF RESISTANCE
DEVELOPED AFTER CONTINUOUS
TREATMENT WITH PACLITAXEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

MENTORI:

dr Svetlana Radović,
vanredni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

dr Milica Pešić,
naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Nikola Tanić,
naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

dr Sabera Ruždijić,
naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

dr Ivana Aljančić,
viši naučni saradnik Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Datum obrane:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu, u okviru projekta #143009 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj, pod rukovodstvom dr Sabere Ruždijić i u okviru projekta III41031 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj, pod rukovodstvom dr Nikole Tanića.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Milici Pešić, koja je kvalitetno osmislila ovu disertaciju i pružala mi pomoć u svim fazama njene realizacije. Neizmerno joj se zahvaljujem na velikom poverenju i podršci koju mi je ukazivala u toku izrade ove disertacije u čijem ostvarenju mi je uvek pomagala svojim znanjem i iskustvom.

Dr Saberi Ruždijić se zahvaljujem na pruženoj prilici za rad u nauci i nesebičnoj podršci koju mi je pružala tokom izrade ove disertacije, kao i što mi je omogućila da provedem dragoceno vreme i steknem novo naučno iskustvo u Laboratoriji za biomedicinska istraživanja Akademije Atine.

Dr Sarantis Gagosu i Marii Chiourei se zahvaljujem na pomoći u izradi i tumačenju rezultata dobijenih kariotipizacijom ćelijskih linija.

Dr Nikoli Taniću se zahvaljujem na veoma korisnim savetima u eksperimentalnom radu, kao i na stimulativnim raspravama u vezi tumačenja dobijenih rezultata.

Svojim koleginicama iz laboratorije 25 (dr Jasni Banković, Vedrani Milinković, Zorici Milošević i Sonji Stojković) se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, kao i na izvanrednoj saradnji i druženju u laboratoriji.

Posebno se zahvaljujem dr Tijani Stanković, koja je sa mnom učestvovala u indukciji rezistencije kod glioblastoma.

Koleginicama iz laboratorija 32 i 33 se zahvaljujem na pomoći koju su mi pružale tokom izrade ove disertacije.

REZIME

Glavni uzrok neuspeha hemioterapije u lečenju kancera je pojava višestruke (engl. „multi-drug“) rezistencije (MDR). Efikasnost paklitaksela (PTX) je često ograničena pojavom rezistencije. Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje molekularnih i fenotipskih promena u toku razvoja MDR-a indukovanih PTX-om kod ćelijskih linija humanog karcinoma debelog creva (DLD1) i glioblastoma (U87). Takođe je testirana upotrebljivost dobijenih MDR modela u evaluaciji četiri anti-kancer agensa.

Kontinuirani tretman PTX-om doveo je do razvoja MDR-a kod obe ispitivane ćelijske linije koje su postale rezistentne na strukturno i funkcionalno različite hemioterapeutike. Nakon potvrde prisustva ukrštene rezistencije kod novo-uspostavljenih ćelijskih linija DLD1-TxR i U87-TxR, analizirana je ekspresija membranskih transportera uključenih u razvoj MDR-a na nivou iRNK. Čelije su imale povišen nivo ekspresije *mdr1* gena i smanjen nivo ekspresije *mrp1* gena. Prekomerna ekspresija P-glikoproteina (P-gp), koji kodira *mdr1* gen, je uočena kod obe MDR ćelijske linije. Analiza na protočnom citofluorimetru je pokazala da je akumulacija P-gp supstrata (rodamina 123 i doksorubicina) kod DLD1-TxR i U87-TxR ćelija značajno manja u poređenju sa odgovarajućim parentalnim ćelijama, DLD1 i U87. Značajno smanjenje ekspresije *gst- π* gena i koncentracije glutationa (GSH) je uočeno kod U87-TxR ćelija. Sekretacija vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF) je inhibirana u jednokratnom tretmanu kod ćelijskih linija karcinoma debelog creva i u kontinuiranom tretmanu kod ćelijske linije glioblastoma. Analiza ćelijskog ciklusa je pokazala da je jednokratni tretman PTX-om kod ćelijskih linija humanog karcinoma debelog creva praćen porastom subG0 faze, odnosno povećanjem procenta mrtvih ćelija, dok je kod ćelija glioblastoma došlo do umiranja tokom interfaze (G1, S ili G2). MDR tumorske ćelijske linije su stekle nove strukturne i numeričke hromozomske aberacije. Sticanje MDR fenotipa kod U87-TxR ćelija je praćeno smanjenem jednog nivoa ploidije. Takođe je uočen gubitak hromozomskog regiona 6q kod obe rezistentne ćelijske linije, kao i inaktivacija *p53* tumor spresor gena kod U87-TxR ćelija i *PTEN* tumor supresor gena kod DLD1-TxR ćelija.

Dalje je analizirana anti-kancer aktivnost i potencijal za reverziju MDR-a Akt inhibitora (GSK690693), Ras inhibitora (Tipifarnib) i dva inhibitora P-gp-a (jatrofanski diterpenoidi Eufodendrofana H-Euph H i Eufodendrofane S -Euph S). Njihova efikasnost varira u zavisnosti od razlika u tipu ćelija, postojanja MDR fenotipa ili promena u tumor supresorima. Tipifarnib, Euph H i S su značajno povećali senzitivnost MDR ćelijskih linija na PTX.

Kontinuirani tretman PTX-om dovodi do prekomerne ekspresije P-gp-a i sticanja MDR fenotipa kod ćelijskih linija humanog karcinoma debelog creva i glioblastoma. MDR ćelije su stekle nove molekularne i citogenetske karakteristike, dok su suprimirani neki mehanizmi MDR-a i progresije tumora kao što su GSH detoksifikacioni sistem i sekrecija VEGF-a. Ovi rezultati ukazuju da tretman PTX-om može imati veliki značaj u terapiji karcinoma debelog creva i glioblastoma, čak i u prisustvu MDR-a. Uprkos ograničenjima o kojima se govori u literaturi u vezi upotrebljivosti MDR *in vitro* modela, ispitivanja promena izazvanih veštačkim razvojem MDR-a su i dalje neophodna i aktuelana. Zbog toga, ove MDR tumorske ćelijske linije predstavljaju značajan eksperimentalni model za testiranje novih anti-kancer agenasa.

KLJUČNE REČI: Višestruka (engl. „multi-drug“) rezistencija (MDR), paklitaksel (PTX), karcinom debelog creva, glioblastom, P-glikoprotein, anti-kancer agensi

OBLAST: Molekularna onkologija

UŽA OBLAST: Kancerogeneza

UDK BROJ: 615.277 : 57.085.2 : [616-006.6 + 616-006.4] (043.3)

SUMMARY

Multi-drug resistance (MDR) is a major obstacle to successful cancer treatment. The efficacy of paclitaxel (PTX) is often limited by appearance of drug resistance. The aim of this study was to explore molecular and phenotypic alterations during development of MDR induced by PTX in human colon carcinoma (DLD1) and glioblastoma (U87) cell lines. We also tested the usefulness of developed MDR models in the evaluation of four anti-cancer agents.

Continuous treatment with PTX led to the development of MDR in both tested cancer cell lines that became resistant to structurally and functionally unrelated chemotherapeutics. After confirmation of the cross-resistance in newly established DLD1-TxR and U87-TxR, we analyzed the mRNA expression of membrane transporters involved in MDR. The cells had increased levels of *mdr1* gene expression, while *mrp1* was decreased. Over-expression of P-glycoprotein (P-gp), coded by *mdr1*, was observed in both MDR cancer cell lines. Flow cytometry analyzes showed that the accumulation of P-gp substrates (rhodamine 123 and doxorubicin) in DLD1-TxR and U87-TxR was significantly lower compared to DLD1 and U87, respectively. The significant depletion of *gst- π* gene expression and glutathione (GSH) concentration was observed in U87-TxR. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) secretion was inhibited by single PTX treatment of colon cancer and in continuous treatment of glioblastoma cell lines. The analysis of cell cycle kinetics revealed extensive cell death in colon cancer cells that were accumulated in subG0 phase after PTX treatment, while glioblastoma cells died through interphase (G1, S or G2). The MDR cancer cell lines acquired novel structural or numerical chromosomal aberrations. Polyploidy reduction was observed after development of MDR in U87-TxR. Losses of 6q in both resistant cancer cell lines and inactivation of p53 in U87-TxR and PTEN in DLD1-TxR were also revealed.

We evaluated the anti-cancer activities and MDR reversal potential of the Akt inhibitor (GSK690693), the Ras inhibitor (Tipifarnib) and two P-gp inhibitors (jatrophone diterpenoids Euphodendrophane H-Euph H and Euphodendrophane S -Euph S). Their effects vary due to the cell-type differences, existence of MDR phenotype or tumor suppressors' alterations. Tipifarnib, Euph H and S, significantly sensitized MDR cancer cells to PTX.

In conclusion, continuous PTX treatment caused the over-expression of P-gp and acquisition of MDR in colon cancer and glioblastoma cell lines. MDR cancer cells obtained new molecular and cytogenetic characteristics, while some mechanisms of MDR and tumor progression such as GSH detoxification system and VEGF secretion were suppressed. The results implicate the PTX treatment as an important clinical tool for colon carcinoma and glioblastoma treatment even in the presence of MDR. Despite limitations discussed in literature due to the usefulness of MDR *in vitro* models, further examinations of changes provoked by artificially developed MDR are still emerging. Therefore, our MDR cancer cell lines present valuable tool for pre-clinical evaluation of new anti-cancer agents.

KEY WORDS: Multi-drug resistance (MDR), paclitaxel (PTX), colon cancer, glioblastoma, P-glycoprotein, anti-cancer agents

RESEARCH AREA: Molecular oncology

RESEARCH FIELD:Cancerogenesis

UDC NUMBER: 615.277 : 57.085.2 : [616-006.6 + 616-006.4] (043.3)

LISTA SKRAĆENICA:

ABC - engl. ATP binding cassette (ATP vezujući transporteri)
ADP - adenozin difosfat
Akt - familija serin/treonin specifičnih protein kinaza
ANOVA - engl. analysis of variance
APC – engl. adenomatous polyposis coli gen
ATP - adenozin trifosfat
Bad - engl. Bcl-2-associated death promoter
Bak - engl. Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax - engl. Bcl-2-associated X protei
Bcl-2 - engl. B cell lymphoma-2 (familija proapoptotskih i antiapoptotskih proteina, koja reguliše propustljivost na spoljnoj membrani mitohondrija)
Bcl-X_L - engl. B cell lymphoma-extra large
Bcl-X_S - engl. B cell lymphoma-extra small
Bcr-Abl - konstitutivno aktiva tirozin kinaza, nastala fuzijom Abl1 gena sa hromozoma 9 i BCR (engl. breakpoint cluster region) sa hromozoma 22
Bim - engl. Bcl-2-interacting mediator of cell death
BSA - engl. bovine serum albumin (albumin goveđeg seruma)
cdk - engl. cyclin dependent kinase (ciklin zavisna kinaza)
CDKN1A - engl. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDKN1B - engl. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CCNG2 - ciklin G2 gen
CI – kombinacioni indeks
CIN - engl. chromosomal instability (hromozomska nestabilnost)

c-Jun - pripada familiji transkripcionih faktora ranog odgovora (sa c-Fos formira AP-1)
c-Myc - protoonkogen (kodira transkripcione faktore, koji regulišu ekspresiju velikog broja gena)
Cpt - cisplatin
CYP - citohrom P450
DAPI - 4-6-diamidin-2-fenilindol
ddATP - didezoksiadenozin-trifosfat
ddCTP - didezoksicitidin-trifosfat
ddGTP - didezoksiguanozin-trifosfat
ddNTP - didezoksiribonukleotid-trifosfat
ddTTP - didezoksitimidin-trifosfat
dNTP - deoksiribonukleotid-trifosfat
DEPC - dietil pirokarbonat
Dex-VER - R±Verapamil
DMSO - dimetilsulfoksid
DNK - deoksiribonukleinska kiselina
DOX - doksorubicin
DTT - ditiotreitol
E2F4- E2F transkripcioni faktor 4 (učestvuje u kontroli ćelijskog ciklusa i delovanja tumor supresora)
EDTA - etilendiamin tetraacetat
EGF - engl. epidermal growth factor (epidermalni faktor rasta ili njegov receptor)
EGFR - engl. epidermal growth factor receptor (receptor za epidermalni faktor rasta)
EIF4E - engl. eukaryotic translation initiation factor 4E
ELISA - engl. enzyme-linked immuno sorbent assay
Elk-1 - engl. ETS-Like Gene 1
EMT - engl. epithelial-mesenchymal transition
EPI - epirubicin
ERK - engl. extracellular signal-regulated protein kinases (kinaza regulisana vanćelijskim signalima)

Euph H/S - eufodendrofan H/S
 FAP – engl. familial adenomatous polyposis
 Fas ligand - pripada TNF familiji (pokreće apoptozu)
 FBS - engl. fetal bovine serum (fetalni goveđi serum)
 FGF - engl. fibroblast growth factor (faktor rasta fibroblasta)
 FOXO - engl. forkhead box transcription factors
 GADD4 - engl. growth arrest and DNA-damage inducible
 gapdh - glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaza
 GC element - deo DNK bogat guaninom i citozinom
 GDP - guanozin difosfat
 GM - glioblastoma multiforme
 GSH - redukovani glutation
 GSK3 - engl. glycogen synthase kinase 3
 GSSG - glutation disulfid
 GST - glutation-S-transferaza
 gst- π - gen koji kodira π formu GST
 GS-X - eksportna pumpa za komplekse konjugovane glutationom
 GTP - guanozin trifosfat
 HBP1 - engl. HMG-box transcription factor 1
 HGF – engl. hepatocyte growth factor
 HIF – engl. hypoxia-inducible factor
 HNPCC – engl. hereditary nonpolyposis colorectal cancer
 HRP - engl. horseradish peroxidase
 IC₅₀ - inhibitorna koncentracija (50% inhibicije ćelijskog rasta u odnosu na kontrolu)
 JNK/SAPK - engl. c-Jun amino-terminal kinases/stress-activated protein kinases
 kDa - kilo daltona
 kDNK - komplementarna DNK (engl. cDNA)
 Kit - receptor citokina sa tirozin kinaznom aktivnošću
 LOH - engl. loss of heterozygosity (gubitak heterozigotnosti)

MAP - engl. microtubule-associated proteins
 MAPK - engl. mitogen activated protein kinase
 MCC - engl. mutated in colorectal cancer
 MDR - engl. multidrug resistance
 mdrl - gen koji kodira P-gp
 MEK - engl. mitogen-activated protein kinase kinase
 MEM – engl. minimum essential medium
 MET - engl. mesenchymal-epithelial transition
 MIN - engl. microsatellite instability (mikrosatelitska nestabilnost)
 M-MLV - engl. Moloney murine leukemia virus
 MMR - engl. mismatch repair
 mTOR - engl. mammalian target of rapamycin
 MSI - engl. microsatellite instability, prev. mikrosatelitska nestabilnost
 MRP- engl. multidrug resistance associated protein (protein povezan sa nastankom MDR)
 NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
 NBD - engl. nucleotide binding domain (ATP vezujući domen na ABC transporteru)
 NF-kB - nuklearni faktor kB
 NSCLC - engl. non- small cell lung carcinoma (nesitnoćelijski karcinom pluća)
 oligo-dT - oligo-deoksitimidin
 PTX - paklitaksel
 PBS - fosfatni pufer
 PDK1 - engl. phosphoinositide dependent kinase-1
 PCR - engl. polymerase chain reaction (lančana reakcija polimeraze)
 P-gp - P-glikoprotein
 PI - propidijum jodid
 PI3K - fosfatidil inozitol 3-kinaza
 PIN - engl. point mutation instability (nestabilnost pojedinačnih nukleotida)
 PIP2 - fosfatidilinozitol 4,5 bisfosfat

PIP3 - fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat
PTEN - engl. phosphatase and tensin
homolog deleted on chromosome ten
(homolog tirozin fosfataza i tenzina)
PUMA - engl. *p53* upregulated
modulator of apoptosis
Raf - engl. rapidly accelerated
fibrosarcoma
Ras - engl. retrovirus-associated DNA
sequences
Rb - retinoblastoma tumor supresor
Rho 123 - rodamin 123
RNK - ribonukleinska kiselina
RT - reverzna transkripcija
SCLC - engl. small cell lung carcinoma
(sitnoćelijski karcinom pluća)
SNP - engl. single-nucleotide
polymorphism
SRB - sulforodamin B
SSA - sulfosalicilna kiselina
Taq - engl. *Thermus aquaticus* (bakterija
iz koje je izolovana termostabilna DNK
polimeraza)
TB - engl. trypan blue dye exclusion
TBE - Tris boratni EDTA puffer
Tcf - engl. T-cell factor
TKI - inhibitori tirozin kinaza
TMD - engl. transmembrane domain
(domen ABC transportera, koji prolazi
kroz membranu)
TNF α - tumor necrosis factor α (faktor
tumorske nekroze)
TRIS - trihidroksimetil aminometan
Tukey HSD - engl. Tukey high speed data
(metod višestruke komparacije u
statistici)
TQ - tarikvidar
VBL - vinblastin
VEGF - engl. vascular endothelial growth
factor (vaskularni endotelijalni faktor
rasta)
VP-16 - etoposid
wt - engl. wild type

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. KANCER-OPŠTE KARAKTERISTIKE	1
1.1.1. Održavanje signala za ćelijsku deobu	3
1.1.1.1. Ras/Raf/MEK/ERK signalni put	3
1.1.1.2. PI3K/Akt signalni put.....	5
1.1.2. Neosetljivost na delovanje signala koji sprečavaju ćelijski rast.....	7
1.1.3. Izbegavanje apoptoze	8
1.1.4. Neograničen replikativni potencijal	9
1.1.5. Podsticanje angiogeneze.....	9
1.1.6. Invazivnost i metastaziranje	10
1.2. KARCINOMI DEBELOG CREVA	11
1.2.1. Nasledni oblici karcinoma debelog creva	11
1.2.2. Sporadični karcinomi debelog creva.....	13
1.2.3. Terapija karcinoma debelog creva	14
1.3. GLIOMI	15
1.4. VIŠESTRUKA REZISTENCIJA – POJAM I MEHANIZMI	17
1.4.1. P-glikoprotein	17
1.4.2. MRP	20
1.4.3. Glutationski detoksifikacioni sistem	20
1.4.4. Izbegavanje apoptoze	22
1.4.5. Paklitaksel – mehanizam delovanja i razvoj rezistencije.....	23
1.5. PREVAZILAŽENJE VIŠESTRUKRE REZISENCIJE.....	27
1.5.1. Strategije za prevazilaženje rezistencije na paklitaksel	30
1.5.2. Jatrofani	31
1.5.3. Akt inhibitor-GSK690693	33
1.5.4. Ras inhibitor-Tipifarnib.....	34
2. CILJEVI.....	35
3. MATERIJAL I METODE	36
3.1. DROGE.....	36
3.2. HEMIKA LIJE I REAGENCI	36
3.3. KULTIVISANJE ĆELIJA	37
3.3.1. DLD1 i DLD1-TxR	37
3.3.2. U87 i U87-TxR.....	37
3.3.3. Jednokratni tretman i istovremene kombinacije	38
3.4. ODREĐIVANJE BROJA ĆELIJA	39
3.5. SRB TEST VIJABILNOSTI	39
3.6. ANALIZA EFEKATA DOBIJENIH KOMBINOVANJEM DROGA.....	40
3.7. IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISELINA.....	41
3.7.1. Izolacija genomske DNK	41
3.7.2. Provera kvaliteta DNK	41
3.7.3. Izolacija RNK.....	42
3.7.4. Provera kvaliteta RNK	43
3.8. ANALIZA EKSPRESIJE GENA RT-PCR METODOM	43
3.8.1. Reakcija reverzne transkripcije	43

3.8.2. PCR reakcija	44
3.8.3. Analiza PCR produkta.....	45
3.9. ANALIZA EKSPRESIJE P-GLIKOPROTEINA	45
3.10. ODREĐIVANJE PRISUSTVA POJEDINAČNIH NUKLEOTIDNIH POLIMORFIZAMA <i>MDR1</i> GENA.....	46
3.11. AKUMULACIJA RODAMINA 123 I DOKSORUBICINA	46
3.12. KOLORIMETRIJSKA DETEKCIJA GLUTATIONA (GSH).....	47
3.13. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VEGF-a U SUPERNATANTU ĆELIJSKE KULTURE	48
3.14. ANALIZA ĆELIJSKOG CIKLUSA	49
3.15. CITOGENETSKA ANALIZA.....	50
3.16. ANALIZA MUTACIONOG STATUSA <i>p53</i> GENA	51
3.17. ANALIZA GUBITKA HETEROZIGOTNOSTI <i>p53</i> I <i>PTEN</i> (LOH ANALIZA).....	53
3.18. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	56
4. REZULTATI.....	57
4.1. POSTEPENO IZAZIVANJE REZISTENCIJE RASTUĆIM KONCENTRACIJAMA PAKLITAKSELA ..	57
4.1.1. Selekcionisanje DLD1-TxR ćelija	57
4.1.2. Selekcionisanje U87-TxR ćelija.....	58
4.2. UTVRĐIVANJE PRISUSTVA MDR FENOTIPA U NOVIM REZISTENTNIM LINIJAMA	59
4.3. ANALIZA EKSPRESIJE MDR GENA	60
4.4. ANALIZA EKSPRESIJE P-GLIKOPROTEINA	61
4.5. POJEDINAČNI NUKLEOTIDNI POLIMORFIZMI <i>MDR1</i> GENA	62
4.6. ANALIZA AKTIVNOSTI P-GLIKOPROTEINA.....	62
4.7. GLUTATIONSKI DETOKSIFIKACIONI SISTEM.....	64
4.8. UTICAJ TRETMANA PAKLITAKSELOM NA ĆELIJSKI CIKLUS KOD PARENTALNIH I REZISTENTNIH LINIJA	65
4.9. UTICAJ PAKLITAKSELA NA SEKRECIJU VEGF-a	67
4.10. ANALIZA EKSPRESIJE <i>VEGF165</i> iRNK.....	68
4.11. CITOGENETSKA ANALIZA.....	69
4.12. ANALIZA PROMENA U <i>P53</i> TUMOR SUPRESOR GENU.....	71
4.13. ANALIZA PROMENA U <i>PTEN</i> TUMOR SUPRESOR GENU	72
4.14. TESTIRANJE NOVIH SUPSTANCI U MDR MODELIMA	73
4.15. KOMBINACIJE GSK690693 I TIPIFARNIBA SA PAKLITAKSELOM	74
4.16. AKUMULACIJA RODAMINA 123 NAKON TRETMANA SA EUPH H I S	75
4.17. REVERZIJA REZISTENCIJE NA PAKLITAKSEL	76
4.18. PROMENE U ĆELIJSKOM CIKLUSU NAKON TRETMANA JATROFANIMA (EUPH H/S) I PAKLITAKSELOM.....	79
5. DISKUSIJA	81
5.1. MDR FENOTIP KOD ĆELIJSKIH LINIJA SELEKCIONISANIH PAKLITAKSELOM.....	82
5.2. UTICAJ PAKLITAKSELA NA DETOKSIFIKACIONI SISTEM.....	84
5.3. UTICAJ PAKLITAKSELA NA PROCES TUMORSKE ANGIOGENEZE.....	85
5.4. UTICAJ PAKLITAKSELA NA ĆELIJSKI CIKLUS.....	86
5.5. MOLEKULARNO – I CITO-GENETSKE PROMENE INDUKOVANE RAZVOJEM REZISTENCIJE....	87
5.6. VALIDACIJA NOVIH MDR MODELA	89
5.7. POVEĆANJE OSETLJIVOSTI NA PAKLITAKSEL.....	90
6. ZAKLJUČCI.....	93
7. LITERATURA	95

1. UVOD

1.1. KANCER-OPŠTE KARAKTERISTIKE

Kancer je kompleksno genetičko oboljenje somatske ćelije koje u kasnim fazama ima manifestacije sistemskog oboljenja. Usled akumulacije mutacija u delovima genoma, normalna ćelija prolazi kroz proces transformacije i nastaje kancer ćelija. Promene odgovorne za nastanak kancer ćelije dešavaju se u tri glavne grupe gena. Prve dve grupe čine onkogeni i tumor supresori, koji su direktno odgovorni za regulaciju stope ćelijske deobe i smrti, a treću grupu predstavljaju geni odgovorni za očuvanje stabilnosti genoma, koji regulišu stopu mutacija u ćeliji (Vogelstain i Kinzler, 2004).

U normalnim ćelijama protoonkogeni kodiraju proteinske produkte koji pozitivno regulišu ćelijski rast i proliferaciju, a negativno proces apoptoze. Mutacionim događajima, kao što su amplifikacije, translokacije i tačkaste mutacije, protoonkogeni se transformišu u onkogene tj. prekomerno se eksprimiraju, a njihovi proteinski produkti postaju prekomerno aktivni. Promene u samo jednom od alela protoonkogenata su dovoljne da dovedu do njegove aktivacije (Vogelstain i Kinzler, 2004). Tumor supresor geni imaju suprotnu ulogu u ćeliji i odgovorni su za inhibiciju ćelijskog rasta i deobe kao i promociju ćelijske smrti. Za razliku od onkogenata, mutacioni događaji u tumor supresor genima smanjuju aktivnost njihovih proteinskih produkata. Ove promene obuhvataju mutacije sa izmenjenim smislom, delecije, incercije i epigenetičko utišavanje. Za inaktivaciju tumor supresora su potrebna dva mutaciona događaja. Prvi mutacioni događaj pogađa jedan od alela i to je najčešće tačkasta mutacija, praćena delecijom na drugom alelu, što dovodi do pojave gubitka heterozigotnosti (LOH) (Knudson, 2002). Mutacioni događaji u onkogenima i tumor supresor genima ćeliji u transformaciji pružaju niz adaptivnih i selektivnih prednosti u pogledu rasta i razmnožavanja u odnosu na okolne ćelije datog tkiva.

Kao posledica mutacija u genima odgovornim za očuvanje stabilnosti genoma koja dovodi do povećane ukupne stope mutacija, transformisane ćelije se dodatno odlikuju i izraženom genomskom nestabilnošću (Loeb, 2001). Definisana su tri tipa genomske nestabilnosti: hromozomska nestabilnost (CIN), mikrostatelitska nestabilnost

(MIN) i stabilnost uzrokovana mutacijama u pojedinačnim nukleotidima (PIN) (Bielas i saradnici, 2006). Hromozomska nestabilnost predstavlja kontinuirano sticanje ili gubitak celih hromozoma ili delova hromozoma. To je najzastupljeniji oblik genomske nestabilnosti koji dovodi do pojave abnormalnih kariotipova i heterogene populacije kancer ćelija. Ovakvi abnormalni kariotipovi su posledica gubitka pravilne segregacije hromozoma tokom mitoze i to usled deregulacije kontrolnih tačaka formiranja deobnog vretena, promena u regulaciji kohezije sestrinskih hromatida, amplifikacije centrozoma, narušavanja funkcije kinetohora, poremećaja u regulaciji ćelijskog ciklusa. Hromozomska nestabilnost dovodi do lošije prognoze kancera i rezistencije na hemioterapiju (McClelland i saradnici, 2009).

Maligno tumorsko tkivo, tj. kancer nastaje kroz proces klonalne ekspanzije i selekcije. Umnožavanjem izvorne kancer ćelije nastaju nove nasumične mutacije kao posledica stalne deobe i prisustva genomske nestabilnosti. Samo određene kombinacije mutacija će pružiti selektivnu prednost, dok će većina novih mutantnih varijanti biti eliminisana usled selektivnog pritiska. Dalja evolucija tumora se odvija na isti način uzastopnim ciklusima deoba, mutiranja novih ćelijskih klonova i njihove prirodne selekcije. Usled ovakvog razvoja maligni tumori predstavljaju heterogene populacije kancer ćelija, među kojima postoji velika genetička raznolikost (Marusyk i Polyak, 2010). Pored heterogene populacije kancer ćelija, maligni tumori se sastoje i od normalnih ćelija strome kao i ekstraćelijskog matriksa (Diaz-Cano SJ, 2008). Bez obzira na prisustvo velike genetičke raznolikosti među kancer ćelijama, sve kancer ćelije dele određene karakteristike kao što su: održavanje signala za ćelijsku deobu, neosetljivost na delovanje signala koji sprečavaju rast ćelija, izbegavanje apoptoze, neograničen replikativni potencijal, podsticanje angiogeneze, invazivnost i metastaziranje. Ove karakteristike predstavljaju osnovna obeležja malignih tumora (Hanahan i Weinberg, 2011).

Prema tipu ćelija od koje nastaju, odnosno tkiva, kanceri se mogu podeliti na:

1. karcinome – poreklom od epitelijalnih ćelija;
2. sarkome – nastaju od mezenhimalnih ćelija vezivnog tkiva;
3. leukemije i limfome – vode poreklo od ćelija hematopoetskih tkiva;
4. melanome – nastaju od melanocita;
5. neuroektodermalni tumori – vode poreklo od ćelija embrionalnog neuroektoderma koje daje komponente centralnog i perifernog nervnog sistema (Vogelstein i Kinzler, 2004).

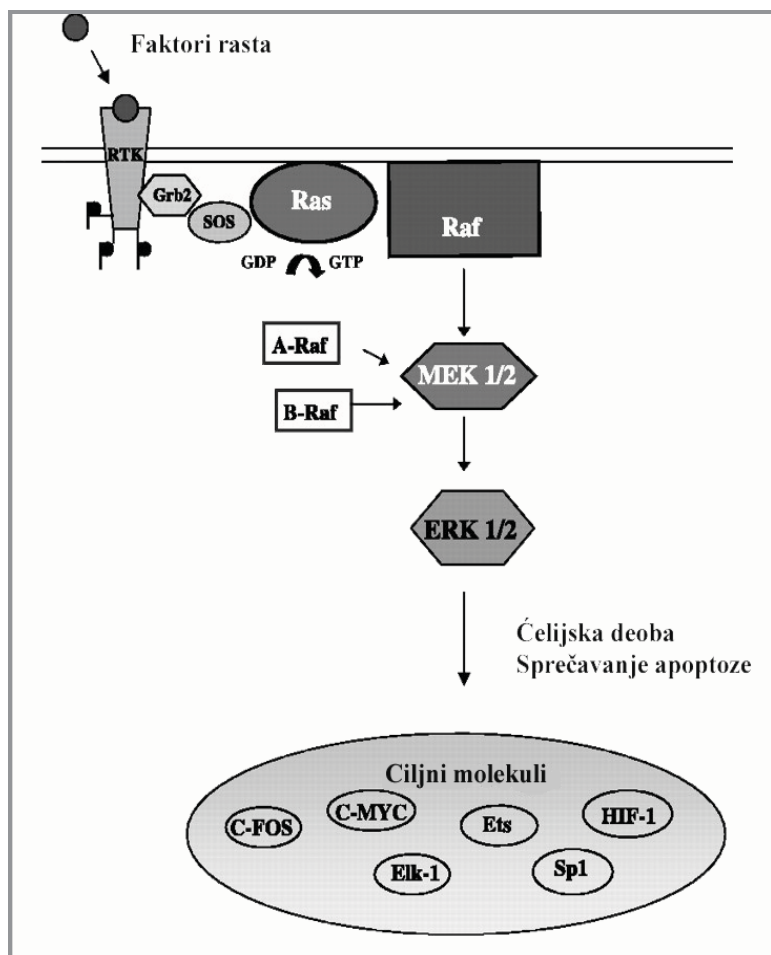
1.1.1. Održavanje signala za ćelijsku deobu

Jedna od glavnih karakteristika tumorskih ćelija je njihova sposobnost da se stalno dele. Normalna tkiva pažljivo kontrolišu stvaranje i oslobađanje signala koji promovišu rast i tako obezbeđuju homeostazu broja ćelija i održavaju normalnu arhitekturu tkiva i njegovu funkciju. Signali koji promovišu rast se uglavnom prenose preko faktora rasta koji se vezuju za receptore na površini ćelije. Receptori dalje prenose signale preko brojnih unutarćelijskih signalnih puteva i regulišu ćelijski ciklus, rast ćelije i preživljavanje. Tumorske ćelije mogu da steknu sposobnost za održavanje signala za ćelijsku deobu na nekoliko različitih načina. One same mogu da stvaraju faktore rasta koji se vezuju za odgovarajuće receptore na površini tumorskih ćelija, stvarajući autokrinu stimulaciju deobe. Nasuprot tome, tumorske ćelije mogu da stimulišu normalne ćelije u tumorskoj stromi da oslobađaju faktore rasta (Bhowmick i saradnici, 2004). Takođe, povećana ekspresija receptora na površini tumorske ćelije čini ovu ćeliju preosetljivom na prisustvo ograničene količine faktora rasta. Strukturne promene receptora kao i aktivacija komponenti signalnih puteva koji se nalaze nishodno od receptora obezbeđuju tumorskoj ćeliji stalnu deobu nezavisno od prisustva faktora rasta (Witsch i saradnici, 2010).

1.1.1.1. Ras/Raf/MEK/ERK signalni put

Ras/Raf/MEK/ERK signalni put je uključen u procese ćelijske deobe i preživljavanja tako što prenosi signale sa receptora na površini ćelije ka transkripcionim faktorima. Takođe, ovaj signalni put reguliše apoptozu post-translacionom fosforilacijom regulatornih molekula apoptoze kao što su Bad, caspaza 9 i Bcl-2 (McCubrey i saradnici, 2007). Ras je mali, GTP-vezujući protein, koji prenosi signale ka nekoliko signalnih puteva uključujući Raf/MEK/ERK i PI3K/Akt. Vezivanjem citokina, faktora rasta i mitogena za odgovarajuće receptore, RasGDP se prevodi u RasGTP, menja svoju konformaciju i postaje aktivan. RasGTP privlači Raf protein ka plazma membrani, gde Raf postaje aktivan (McCubrey i saradnici, 2007). Raf protein je serin/treonin kinaza koja fosforiliše i aktivira mitogen-aktiviranu protein kinazu 1 (MEK1). Postoje tri člana familije Raf proteina (A-Raf, B-Raf i Raf-1) i sva tri člana aktiviraju MEK1, ali sa različitim biohemijskim potencijalom (B-Raf > Raf-1 > A-Raf). MEK1 je tirozin i serin/treonin kinaza, čiji je prvenstveni ciljni molekul kinaza

regulisana ekstraćelijskim signalima (ERK) (Allesi i saradnici, 1994). Za razliku od MEK1, ushodni Raf i nishodni ERK imaju brojne ciljne molekule. Aktivirani ERK se prebacuje u jedro i dalje fosforiliše i aktivira brojne transkripcione faktore uključujući Elk-1, c-Myc, c-Jun (slika 1). Ovi transkripcioni faktori se vezuju za promotore brojnih gena, uključujući gene za faktore rasta i citokine koji su veoma značajni u promovisanju rasta brojnih ćelijskih tipova (Steelman i saradnici, 2011).



Slika 1. Ras/Raf/MEK/ERK signalni put. Nakon vezivanja faktora rasta za tirozin kinazne receptore, aktivira se Ras/Raf/MEK/ERK signalni put koji dovodi do fosforilacije odgovarajućih ciljnih molekula u jedru, što pokreće ćelijsku deobu i sprečava apoptozu (preuzeto i modifikovano od Sridhar i saradnika, 2005).

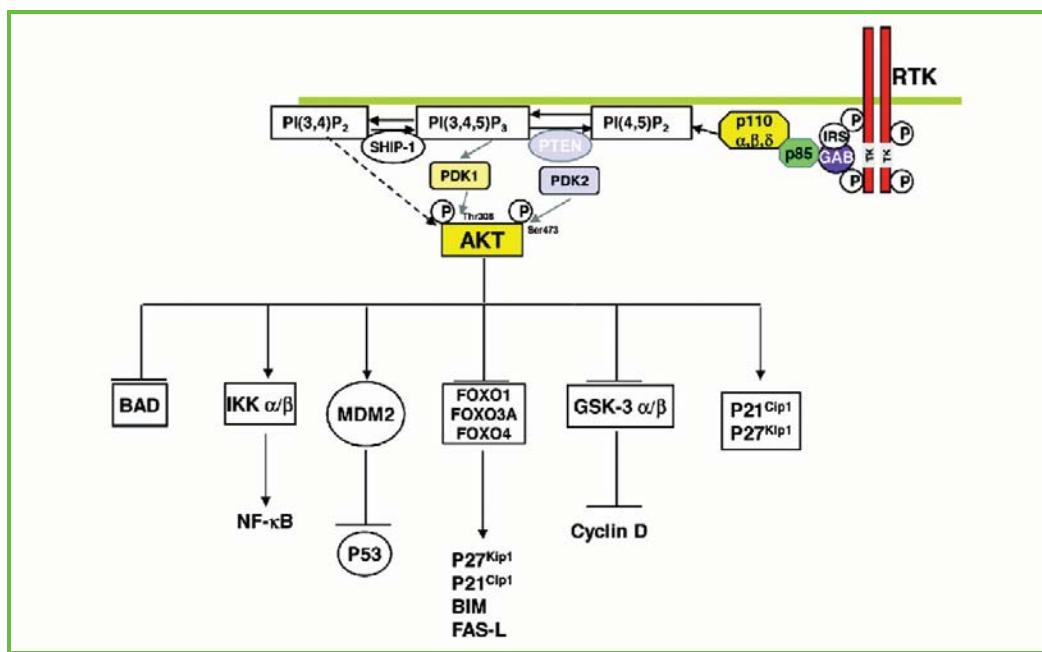
Ras/Raf/MEK/ERK signalni put takođe ima ulogu u sprečavanju apoptoze. Ovaj signalni put fosforiliše pro-apoptotski molekul Bad, što dovodi do njegovog oslobađanja sa mitohondrijalne membrane (Zha i saradnici, 1996). Oslobađanje Bad-a

omogućava Bcl-2 da formira homodimere, čime se stvara anti-apoptotski signal. Ras/Raf/MEK/ERK signalni put takođe fosforiliše i inhibira pro-apoptotski molekul caspazu 9 (Allan i saradnici, 2003).

Ovaj signalni put je često aktiviran u određenim tumorima zbog mutacija ili prekomerne ekspresije receptora kao što su BCR-ABL ili receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) (Steelman i saradnici, 2004). Prekomerna aktivacija ovog signalnog puta se takođe dešava zbog mutacija u *Ras* i *B-Raf* genima. Amplifikacija *ras* proto-onkogen, kao i njegove mutacije koje dovode do ekspresije konstitutivno aktivnog Ras proteina su uočene u 30% humanih karcinoma (Stirewalt i saradnici, 2001). *B-Raf* je često mutiran kod odradenim tipova kancera, pogotovo kod melanoma (27-70%), papilarnih tiroidnih karcinoma (36-53%) i karcinoma jajnika (30%) (Libra i saradnici, 2005; Garnett i Marais, 2004).

1.1.1.2. PI3K/Akt signalni put

PI3K/Akt signalni put reguliše brojne ćelijske funkcije kao što su ćelijski ciklus, metabolizam, rast i preživljavanje. Vezivanjem faktora rasta za receptore sa protein tirozin kinaznom aktivnošću, aktivira se enzim fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K). Ovaj enzim fosforiliše membranski lipid fosfatidilinozitol 3,4-bifosfat (PIP2) i prevodi ga u fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3). PIP3 funkcioniše kao sekundarni ćelijski glasnik i odgovoran je za vezivanje dva enzima za membranu, fosfatidilinozitol zavisnu kinazu 1 (PDK1) i Akt. PDK1 vezan za membranu, fosforiliše i aktivira Akt. Aktivirani Akt se prebacuje u citoplazmu i jedro, gde fosforiliše i aktivira brojne ciljane molekule uključene u regulaciju različitih ćelijskih procesa (Slika 2) (Jiang i Liu, 2008).



Slika 2. PI3K/Akt signalni put. Tirozin kinazni receptor aktivira PI3K kompleks koji transformiše PIP2 u PIP3. PIP3 je odgovoran za vezivanje PDK1 i Akt za membranu gde PDK1 fosforiliše i aktivira Akt. Aktivirani Akt nishodno moduliše brojne ciljne molekule uključene u regulaciju različitih ćelijskih procesa (preuzeto i modifikovano od Park i saradnika, 2010).

Akt povećava sintezu glikogena i ćelijski metabolizam preko inhibicije FOXO familije transkripcionih faktora i glikogen sintaze kinaze 3 (GSK3). Akt je uključen u preživljavanje ćelije tako što inhibira pro-apoptotski protein Bad i FOXO transkripcione faktore, koji regulišu transkripciju pro-apoptotskih proteina Fas-liganda (FasL) i Bim. Akt takođe aktivacijom NF-κB povećava transkripciju anti-apoptotskih gena Bcl-2 i Bcl-XL (Stephens i saradnici, 2005).

PI3K/Akt signalni put igra ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa. Akt stimuliše progresiju ćelijskog ciklusa regulacijom ekspresije inhibitora ćelijskog ciklusa p27 proteina preko inhibicije FOXO transkripcionih faktora. Akt takođe indirektno stabilizuje proteine ćelijskog ciklusa c-Myc i ciklin D1 preko inhibicije GSK3 (Engelman i saradnici, 2006). Kontrola rasta ćelije preko regulacije preživljavanja i ćelijskog ciklusa ukazuje na ključnu ulogu ovog signalnog puta u nastanku kancera.

Aktivacija PI3K/Akt signalnog puta kod određenih tipova kancera se dešava zbog mutacija ili prekomerne ekspresije receptora sa protein tirozin kinaznom

aktivnošću. Prekomerna aktivacija ovog signalnog puta se takođe dešava zbog amplifikacija i mutacija u PI3K i amplifikacija *Akt* gena (Hennessy i saradnici, 2005).

PTEN tumor supresor je ključni negativni regulator PI3K/Akt signalnog puta, koji uklanja 3' fosfat sa PIP3 i tako inhibira signalnu kaskadu nishodno od PI3K. PTEN je često mutiran ili deletiran kod različitih tipova kancera kao što su glioblastomi, karcinomi dojke, karcinomi pluća, melanomi i karcinomi endometrija (Simpson i Parsons, 2001). Mutacije su najčešći oblik inaktivacije ovog tumor supresora kod glioblastoma i karcinoma endometrija, dok se kod ostalih tipova tumora one javljaju sa manjom učestalošću (Leslie i Downes, 2004). Još jedan čest način inaktivacije PTEN-a je delecija, i to pre svega jednog alela gubitkom heterozigotnosti (LOH) (Teng i saradnici, 1997). Inaktivacija PTEN-a je u značajnoj meri posledica i epigenetičkog utišavanja, tj. hipermetilacije njegovog promotora (Sadeq i saradnici, 2011).

1.1.2. Neosetljivost na delovanje signala koji sprečavaju ćelijski rast

Pored sposobnosti da stalno održavaju signale za ćelijsku deobu, kancer ćelije takođe moraju da steknu sposobnost da izbegavaju signale koji sprečavaju njihov rast. Ovi signali uglavnom zavise od delovanja tumor supresor gena. Dva glavna tumor supresor gena su retinoblastoma (*Rb*) i *p53*. Ova dva tumor supresora predstavljaju centralne, kontrolne tačke koje odlučuju da li ćelija može dalje da nastavi kroz ćelijski ciklus ili ulazi u proces starenja i apoptoze.

Rb tumor supresor gen kodira familiju fosfo-proteina odgovornih za zaustavljanje ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa. *Rb* protein može biti fosforilisan ili hipofosforilisan za vreme ćelijskog ciklusa. Aktivna, hipofosforilisana forma *Rb* proteina se vezuje za E2F transkripcioni faktor i sprečava transkripciju gena ključnih za prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Fosforilaciju *Rb* proteina započinju ciklin-zavisna kinaza 4/6 (cdk4/6) i ciklin-zavisna kinaza 2 (cdk2) koje stvaraju komplekse sa ciklinom D, odnosno ciklinom E. Hiperfosforilacija *Rb* proteina dovodi do njegove inaktivacije, što omogućava transkripciju gena neophodnih za DNK replikaciju (Deshpande i saradnici, 2005). Inaktivacija *Rb* proteina se javlja u 90% slučajeva sitnoćelijskih karcinoma pluća (SCLC), dok se kod nesitnoćelijskih karcinoma pluća (NSCLC) javlja u 15-30% slučajeva. Takođe, mutacije u *Rb* genu su zabeležene kod

karcinoma prostate (20%), karcinoma dojke (20%), karcinoma bešike (20-50%) i karcinoma jetre (15-30%) (Burkhardt i Sage, 2008).

p53 je transkripcioni faktor, poznat kao čuvar genoma, koji reaguje i aktivira se usled oštećenja DNK, disbalansa nukleotida, niskog nivoa glukoze, hipoksije, kao i onkogenima. Ukoliko oštećenja ćelije, prvenstveno DNK, nije veliko, p53 dovodi do privremenog zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 ili G2 fazi. p53 preko regulacije ekspresije p21 proteina dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi, odnosno u G2 fazi regulacijom ekspresije GADD45 i 14-3-3- σ proteina (Ferreira i saradnici, 1999). p53 takođe podstiče popravku DNK molekula s obzirom da fizički interaguje sa komponentama reparacionog sistema iskrajanjem nukleotida (Morris i saradnici, 2002). S druge strane, ukoliko je oštećenje DNK veliko, p53 započinje kaskadu događaja koji dovode do apoptoze aktivacijom pro-apoptotskih gena, kao što su *Bax*, *Noxa* i *Puma* (Ferreira i saradnici, 1999).

p53 je mutiran u oko 50% svih tumora. Većina p53 mutacija su mutacije sa izmenjenim smislom (~85%), zatim male delecije i insercije (~8%), kao i mutacije bez smisla (~6%). Većina mutacija je pozicionirana u visoko konzerviranom domenu gena, u okviru egzona 5-9 (Olivier i saradnici, 2002). p53 mutacije menjaju amino-kiselinske ostatke DNK vezujućeg domena, narušavaju konformaciju proteina i remete funkciju proteina (van Oijen i Slootweg, 2000). Iako nema dovoljno podataka, u poslednje vreme se sve više ističe učestalost gubitka heterozigotnosti (LOH) kao mehanizam inaktivacije p53 tumor supresora (Dearth i saradnici, 2007).

1.1.3. Izbegavanje apoptoze

Jedna od glavnih osobina kancer ćelija je njihova sposobnost izbegavanja apoptoze (programirana ili fiziološka smrt). Normalna ćelija je u stanju da, nakon oštećenja, uđe u apoptozu preko dva nezavisna puta. Prvi je spoljašnji apoptotski put, koji stimulišu TNF- α i Fas ligand vezivanjem za svoje receptore (tzv. receptore smrti). Ovo dovodi do aktivacije inicijatorske kaspaze 8 uključene u sprovođenje pro-apoptotskih signala do kaskade efektorskih kaspaza (kaspaze 3 i 7), koje aktiviraju degradaciju enzima i ćelijsku smrt (Ashe i Berry, 2003). Drugi, unutrašnji apoptotski put zavisi od finog balansa između pro- (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad i Bim) i anti-apoptoskih (Bcl-2 i Bcl-XL) članova Bcl-2 familije proteina. Anti-apoptotski proteini se vezuju i suprimiraju pro-apoptotske proteine, prvenstveno Bax i Bak, koji se nalaze

na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani. Nakon oslobađanja od inhibitornog delovanja anti-apoptotskih proteina, Bax i Bak narušavaju integritet mitohondrijalne membrane, što dovodi do oslobađanja pro-apoptotskih signalnih proteina, od kojih je najvažniji citohrom c. Oslobođeni citohrom c aktivira kaskadu efektorskih kaspaza, koje svojim proteolitičkim aktivnostima pokreću apoptozu (Adams i Cory, 2007).

Kancer ćelije su razvile različite strategije kako bi ograničile ili izbegle apoptozu. Jedna od njih su mutacije u genu za p53 koje najčešće dovode do nastanka nefunkcionalnog proteina i ćelija više nije u mogućnosti da zaustavi ćelijski ciklus, popravi oštećenja, niti da uđe u apoptozu (Lowe i saradnici, 2004). Kancer ćelije takođe mogu da izbegnu apoptozu povećanjem ekspresije anti-apoptotskih proteina i smanjenjem ekspresije pro-apoptotskih proteina (Adams i Cory, 2007).

1.1.4. Neograničen replikativni potencijal

Normalne ćelije imaju ograničen životni vek, koji se meri brojem ćelijskih deoba. Unutrašnji molekularni časovnik predstavljaju telomere na krajevima hromozoma. One se sastoje od nizova heksanukleotidnih ponovaka, koji se progresivno skraćuju nakon svake ćelijske deobe i gube sposobnost da štite krajeve hromozoma. Zbog toga, dužina telomerne DNK određuje kroz koliko uspešnih deoba ćelija može da prođe dok se telomere ne skrate i ne izgube svoju zaštitnu funkciju, uvodeći ćeliju u stanje trajnog mirovanja ili apoptozu. Kancer ćelije mogu da prevaziđu problem skraćivanja telomera i na taj način steknu neograničen replikativni potencijal pomoću dva mehanizma. Prvi je povećana ekspresija i aktivnost telomerase, specifične DNK polimeraze, koja dodaje heksanukleotidne ponovke na krajeve telomerne DNK, a drugi je alternativna rekombinacija telomera (Blasco, 2005).

1.1.5. Podsticanje angiogeneze

Kao i normalnim tkivima, za rast tumora neophodno je stalno prisustvo nutritijenata i kiseonika, ali i ukljanjanje produkata metabolizma i ugljen-dioksida. Tumorska vaskulatura, koja nastaje u procesu angiogeneze tj. formiranja novih krvnih sudova, obezbeđuje stalnu razmenu metabolita i kiseonika. Tumorska vaskulatura nastaje zbog pomeranja ravnoteže između stimulatora angiogeneze i njenih inhibitora. Angiogene regulatore oslobađaju tumorske ćelije, ali i normalne ćelije tumorske

strome. Prisustvo angiogenih stimulatora u tumorskoj sredini kao što su vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), faktor rasta fibroblasta (FGF) i faktor rasta hepatocita (HGF) aktivira endotelijalne ćelije kapilara, koje se u normalnim tkivima nalaze u stanju mirovanja. Takođe, smanjena ekspresija angiogenih inhibitora, koju su konstitutivno ekspimirani u normalnim tkivima, dovodi do nastanka pro-angiogenog stanja u tumorskoj sredini (Baeriswyl i Christofori, 2009). Genetičke promene koje dovode do maligne transformacije su odgovorne za nastanak neravnoteže između angiogenih stimulatora i inhibitora. Mutacije koje dovode do gubitka funkcije nekih tumor supresora, kao i aktivacija nekih onkogeni (EGFR, Ras, Myc) menjaju ekspresiju i angiogenih inhibitora i stimulatora. Uticaj mutacija može biti značajno pojačan epigenetskim faktorima kao što su hipoksija i prisustvo faktora rasta i citokina u tumorskoj sredini (Carmeliet i Jain, 2000).

VEGF, najmoćniji do sada poznati angiogeni faktor, je prekomerno ekspimiran u većini solidnih tumora. Gen koji kodira VEGF, *VEGF-A*, se u normalnim uslovima nalazi pod fiziološkom kontrolom hipoksija-inducibilnog faktora-1 (HIF-1). Međutim, povećana ekspresija VEGF-a u tumorskim ćelijama je posledica promena koje dovode do maligne transformacije, kao što su mutacije p53 tumor supresora i prekomerna aktivacija PI3K/Akt signalnog puta (Wojtukiewicz i saradnici, 2001).

1.1.6. Invazivnost i metastaziranje

Jedna od glavnih karakteristika kancer ćelija je njihova sposobnost invazije u okolna tkiva i formiranje metastaza. Ovi događaji su posledica narušavanja interakcija između ćelija i interakcija sa vanćelijskim matriksom kao i aktivacije proteaza vanćelijskog matriksa. Invazija i metastaziranje je višestepeni proces koji započinje lokalnom invazijom u okolna tkiva, zatim ulaskom kancer ćelija u okolne krvne i limfne sudove, što je praćeno izlaskom kancer ćelija u parenhim udaljenih tkiva (ekstravazacija) i formiranjem malih grupacija kancer ćelija (mikrometastaze) koje izrastaju u makroskopske metastaze. Da bi započele invaziju i metastaziranje kancer ćelije moraju da se dediferenciraju i steknu fenotip mezenhimskih ćelija. Ovaj proces se naziva epitelijalno-mezenhimska tranzicija (EMT) (Thiery, 2002). Metastaze obično sadrže morfološke karakteristike primarnih tumora, što znači da se migrirajuće ćelije u udaljenim tkivima ponovo diferenciraju, odnosno prolaze kroz mezenhimsko-epitelijalnu tranziciju (MET) (Brabletz i saradnici, 2005). Ovi procesi obuhvataju

brojne signalne puteve, kao što je Wnt signalni put koji smanjuje ekspresiju ključnog athezionog proteina E-katherina. E-katherin učestvuje u formiranju atherentnih veza između epitelijskih ćelija, tako da njegova smanjena ekspresija omogućava inazivnost i metastaziranje. Nasuprot tome, N-katherin, koji reguliše migraciju neurona i mezenhimskih ćelija za vreme organogeneze, je povećano eksprimiran kod invazivnih kancera ćelija (Cavallaro i Christofori, 2004).

1.2. KARCINOMI DEBELOG CREVA

Karcinomi debelog creva su jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svetu. Po stepenu incidence, to je četvrti najčešći tip kancera kod muškaraca i treći najčešći tip kancera kod žena. U Sjedinjenim Američkim Državama, godišnje se zabeleži 142 000 novo-obolelih, a 50 000 izgubi život (Jemal i saradnici, 2010).

Glavni uzročnici pojave karcinoma debelog creva su genetske predispozicije i sredinski faktori, pri čemu je starenje najveći faktor rizika za pojavu sporadičnih slučajeva karcinoma debelog creva. Naime, preko 90% sporadičnih slučajeva se pojavljuje kod osoba starijih od 50 godina. Ostali faktori rizika uključuju prisustvo karcinoma debelog creva u porodici, ishrana siromašna vlaknima i folatima, a bogata mastima, alkohol, pušenje, gojaznost i dijabetes (Wei i saradnici, 2009). Oko 5% svih slučajeva nastaju zbog naslednih genetičkih mutacija. Od preostalih 95% slučajeva, oko 20% slučajeva imaju pozitivnu porodičnu istoriju, ali se ne mogu svrstati ni u jednu kategoriju naslednih oblika karcinoma debelog creva (Power i saradnici, 2010).

1.2.1. Nasledni oblici karcinoma debelog creva

Kod naslednih formi karcinoma debelog creva prva mutacija pogađa jedan od alela u germinativnoj ćeliji dok se drugi mutacioni događaj javlja u somatskoj ćeliji. Oni obuhvataju oko 5% svih slučajeva karcinoma debelog creva. Dva najčešća oblika su familijarna adenomatozna polipoza (FAP) i nasledni nepolipozni karcinom debelog creva ili Linčov sindrom (Penegar i saradnici, 2007).

FAP je autozomno, dominantno oboljenje koje nastaje zbog mutacija u jednom od alela *APC* tumor supresor gena u germinativnoj ćeliji. FAP obuhvata manje od 1% svih slučajeva karcinoma debelog creva. Pacijenti koji boluju od FAP-a imaju stotine i

hiljade adenomatoznih polipa u debelom crevu, koji se razvijaju u drugoj deceniji života. Rizik od nastanka karcinoma debelog creva kod ovih pacijenata je 100%, ali ovi pacijenti takođe imaju povećan rizik od nastanka karcinoma van debelog creva (jetra, pankreas, želudac, tiroidna žlezda i centralni nervni sistem) (Galiatsatos i Foulkes, 2006). Većina mutacija u *APC* genu su mutacije koje menjaju okvir čitanja ili mutacije bez smisla, koje dovode do prevremenog zaustavljenja sinteze proteina. APC protein je važan regulator homeostaze epitelijalnih ćelija debelog creva. APC reguliše degradaciju citoplazmatskog β -katenina. APC i β -katenin su komponente Wnt signalnog puta. Kada je APC mutiran, citoplazmatski β -katenin se akumulira i vezuje za Tcf familiju transkripcionih faktora, menjajući ekspresiju brojnih gena koji regulišu ćelijsku deobu, diferencijaciju, migraciju i apoptozu (Goss i Groden, 2000).

Nasledni nepolipozni karcinom debelog creva (HNPCC) je autozomno, dominantno oboljenje koje nastaje zbog mutacija u jednom od alela gena za popravku pogrešno sparenih baza (MMR) u germinativnoj ćeliji. Ovo je najčešći nasledni tip karcinoma debelog creva, koji obuhvata 2-3% svih slučajeva. Pacijenti sa HNPCC razvijaju karcinom debelog creva u mlađem dobu nego ostatak populacije. Takođe, ovi pacijenti imaju povećan rizik od nastanka karcinoma van debelog creva kao što su karcinomi endometrijuma, jajnika, želuca, pankreasa i kože (Desai i saradnici, 2008). Jedna od glavnih karakteristika HNPCC je prisustvo mikrosatelitske nestabilnosti (MSI). MSI se ogleda u promeni dužine segmenata mikrosatelitskih ponovaka, tj. u promeni broja kratkih tandemski ponovljenih DNK sekvenci koje su rasute širom genoma. Tokom replikacije mikrosatelitskih regiona često dolazi do insercije ili delecije ponovaka zbog monotone prirode repetitivnih sekvenci. U normalnim uslovima ove promene se ispravljaju pomoću MMR sistema, koji je odgovoran za uklanjanje DNK lezija kao što su pogrešno sparene baze i insercije/delecije koje nastaju tokom replikacije. Međutim, ukoliko je ovaj sistem reparacije DNK oštećenja nefunkcionalan nastale promene u broju mikrosatelitskih ponovaka ostaju neispravljene i fiksiraju se kao mutacije. Geni MMR sistema uključuju *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH3*, *MSH3*, *PMS1* i *Exo1*. Mutacije u *MLH1* i *MSH2* najčešće dovode do nastanka HNPCC (Al-Sohaily i saradnici, 2012).

1.2.2. Sporadični karcinomi debelog creva

Karcinomi debelog creva nastaju postepenom akumulacijom genetskih i epigenetskih promena, koje dovode do transformacije normalne mukoze debelog creva u karcinom. Većina karcinoma debelog creva nastaje od adenoma, koji sadrže neke genetske karakteristike malignih lezija. Transformacija od adenoma u karcinom obično traje između 10 i 15 godina, pri čemu je genomska nestabilnost sastavni deo ove transformacije (Goel i saradnici, 2003).

Hromozomska nestabilnost je najzasupljeniji oblik genomske nestabilnosti kod karcinoma debelog creva i uočena je kod 65-70% sporadičnih slučajeva. Ovaj tip genomske nestabilnosti se manifestuje kroz pojavu aneuploidije, hromozomskih rearanžmana tipa translokacija, delecija i genskih amplifikacija. Ovakvi abnormalni kariotipovi su posledica gubitka pravilne i precizne segregacije hromozoma tokom mitoze. Velike amplifikacije su uočene na hromozomima 7, 8q, 13q, 20, X i velike delecije na hromozomima 1, 4, 5, 8p, 14q, 15q, 17p, 18, 20p, 22q. Mikrosatelitska nestabilnost (MSI) se javlja u oko 15% sporadičnih karcinoma debelog creva i najčešći uzrok pojave MSI je hipermetilacija promotora gena MMR sistema, *MLH1* (Al-Sohaily i saradnici, 2012).

K-Ras proto-onkogen je mutiran u 30-60% karcinoma debelog creva i velikih adenoma. Zbog toga, aktivirani K-Ras ima značajnu ulogu u prelasku iz adenoma u karcinom preko aktivacije nishodnih ciljnih molekula kao što su *Bcl-2* i *E2F4*. Mutirani protein se nalazi u konstitutivno aktivnoj formi zbog oštećena GTP-azne aktivnosti, koja hidrolizuje GTP u GDP (Bolocan i saradnici, 2012).

Gubitak hromozoma 5q je zastupljen kod 20-50% sporadičnih slučajeva karcinoma debelog creva. Na ovom delu hromozoma 5 se nalaze dva značajna gena: *APC* i *MCC* geni. Kao što je prethodno opisano, APC protein je važan regulator homeostaze epitelijalnih ćelija debelog creva. Somatske mutacije APC gena su zastupljene u velikom procentu u ademomima i u 60-80% sporadičnih karcinoma debelog creva, što ukazuje da su mutacije u APC genu rani događaj u kancerogenezi debelog creva (Powell i saradnici, 1992). Gubitak funkcije APC proteina utiče na brojne ćelijske procese kao što su progresija ćelijskog ciklusa, ćelijska deoba, apoptoza i angiogeneza. MCC protein je regulatorni protein ćelijskog ciklusa, koji zaustavlja ćelijski ciklus kao odgovor na oštećenje DNK (Pangon i saradnici, 2010). Pored toga,

MCC protein inhibira Wnt/ β -katenin signalni put bez obzira na prisustvo APC proteina (Fukuyama i saradnici, 2008).

Gubitak hromozoma 17p je zastupljen kod 75% sporadičnih slučajeva karcinoma debelog creva, ali ne i u adenomima, što ukazuje da je gubitak ovog segmenta, koji sadrži p53 tumor supresor gen, kasni događaj u kancerogenezi debelog creva. Gubitak hromozoma 17p je obično praćen mutacijama u p53 tumor supresor genu na drugom alelu, što dovodi do transformacije iz adenoma u karcinom (Grady i Markowitz, 2002).

1.2.3. Terapija karcinoma debelog creva

Prvi korak u lečenju pacijenata sa karcinomima debelog creva je hirurška intervencija, ali se kod više od polovine pacijenata ponovo razvija bolest. Takođe, kod oko 20% pacijenata u vreme dijagnoze su već prisutne metastaze. Zbog toga se u lečenju pacijenata sa kasnim stadijumima karcinoma debelog creva koriste hemioterapija i/ili radioterapija. Standardna hemioterapija kod karcinoma debelog creva uključuje primenu klasičnih citostatika kao što su 5-fluorouracil u kombinaciji sa oksaliplatinom i irinotekanom. Poslednjih godina sve su intenzivnija ispitivanja ciljanih terapija koje specifično pogađaju određene signalne puteve kod ćelija kancera. Do sada je patentirano nekoliko lekova koji su specifični inhibitori EGFR (anti-EGFR antitela – cetuximab) i inhibitori procesa angiogeneze (VEGFR tirozin kinazni inhibitor – bevacizumab) (Jiang i saradnici, 2012). Međutim, lečenje klasičnim hemioterapeuticima, kao i promena ciljane terapije je često otežano zbog razvoja hemio-rezistencije. Zbog toga se proučavaju novi terapijski pristupi sa paklitakselom (PTX) kako bi se poboljšalo lečenje karcinoma debelog creva. Tako je kombinacija PTX-a sa oksaliplatinom, kao i kombinacija PTX-a sa MEK inhibitorom dala veoma obećavajuće rezultate u tretmanu ove bolesti (Fujie i saradnici, 2005; Xu i saradnici, 2009). Takođe, PTX je pokazao značajan efekat u sprečavanju tumorske angiogeneze potstaknute radioterapijom kod karcinoma debelog creva (Toiyama i saradnici, 2009).

1.3. GLIOMI

Oko 80% svih malignih tumora mozga čine gliomi i oni podrazumevaju sve tumore mozga koji vode poreklo od glije. Gliomi se dele na astrocitome, gde spadaju astrocitomi gradusa I, II, III (anaplastični astrocitomi) i IV (glioblastoma multiforme), oligodendrogliome, ependimome i mešovite gliome. Pacijenti koji boluju od glioma imaju veoma lošu prognozu. Preživljavanje je najlošije kod pacijenata koji boluju od glioblastoma, a u okviru svake histološke grupe preživljavanje je najlošije kod starijih pacijenata (Schwartzbaum i saradnici, 2006).

Glioblastoma multiforme (GM) je najčešći i najagresivniji tip malignih tumora mozga. Ovaj tip tumora karakterišu nekontrolisana ćelijska proliferacija, difuzna infiltracija, izražena sklonost ka nekrozi, angiogeneza, snažna rezistencija na apoptozu i genomska nestabilnost. Može se javiti u bilo kom uzrastu, a maksimum učestalosti je između 45. i 75. godine života sa nešto većom incidencom javljanja kod muškaraca (Louis, 2006). Postoje dva različita podtipa glioblastoma - primarni i sekundarni. Većina glioblastoma su primarni glioblastomi (oko 90% slučajeva), koji nastaju *de novo*, bez kliničkih i histoloških dokaza o postojanju lezija nižeg maligniteta. Primarni glioblastomi se obično javljaju kod starijih osoba. Sekundarni glioblastomi nastaju progresijom iz astrocitoma niskog gradusa i anaplastičnih astrocitoma i javljaju se obično kod mlađih osoba. Primarni glioblastomi se takođe češće javljaju kod muškaraca, dok se sekundarni glioblastomi češće javljaju kod žena (Ohgaki i Kleihues, 2007).

Genetičke promene koje dovode do nastanka primarnih i sekundarnih glioblastoma se veoma razlikuju. Amplifikacija gena za receptor epidermalnog faktora rasta (*EGFR*) i mutacije u *PTEN* tumor supresor genu su promene karakteristične za primarne glioblastome, dok su mutacije u *p53* tumor supresor genu najčešće genetičke promene koje dovode do nastanka sekundarnih glioblastoma (Ohgaki i Kleihues, 2007).

EGFR/PI3K/Akt je ključni signalni put u nastanku primarnih glioblastoma. Amplifikacija *EGFR* gena se dešava u oko 40% slučajeva primarnih glioblastoma. Svi primarni glioblastomi sa amplifikacijama *EGFR* gena imaju prekomerno eksprimiran EGFR protein (Ohgaki i saradnici, 2004). Amplikoni *EGFR* gena su često mutirani. Najčešći tip mutacija su delecije između drugog i sedmog egzona (*EGFRvIII*), koje dovode do nastanka konstitutivno aktivnog receptora (Huang i saradnici, 1997). Aktivacijom EGFR pokreće se PI3K/Akt signalni put, što dovodi do povećanog

preživljavanja i proliferacije ćelija. PTEN tumor supresor, ključni negativni regulator PI3K/Akt signalnog puta, je inaktiviran u 15% do 40% slučajeva primarnih glioblastoma (Knobbe i saradnici, 2002).

P53 tumor supresor igra ključnu ulogu u nastanku sekundarnih glioblastoma. Mutacije u *p53* tumor supresor genu su prve genetičke promene koje se detektuju u dve trećine astrocitoma gradusa II. Učestalost ovih promena je slična kod anaplastičnih astrocitoma i sekundarnih glioblastoma, koji nastaju od astrocitoma gradusa II (Watanabe i saradnici, 1997). Većina mutacija u *p53* genu je pozicionirana u kodonima 248 i 273, pa se pretpostavlja da su mutacije u ovim kodonima rani događaj u nastanku sekundarnih glioblastoma (Ohgaki i saradnici, 2004). Mutacije u *p53* tumor supresor genu se javljaju i kod primarnih glioblastoma, ali sa nižom učestalošću (manje od 30% slučajeva). Za razliku od sekundarnih glioblastoma, kod primarnih glioblastoma mutacije u *p53* genu su ravnomerno raspoređene u okviru svih egzona (Ohgaki i saradnici, 2004).

Unazad 40 godina sprovedeno je na stotine kliničkih studija u cilju produženja preživljavanja pacijenata sa GM primenom nekog novog agensa, ali bez nekog značajnog uspeha. Trenutne terapijske opcije glioma uključuju kombinaciju hirurške intervencije, radioterapije i hemioterapije. Primena kompletne hirurške resekcije nije moguća obzirom na difuzni infiltrativni rast ovih tumora (Bralten i French, 2011). Temozolamid se kod pacijenata sa glioblastomima pokazao efikasnim u produženju životnog veka za 3 meseca (Stupp i sar., 2005). Adjuvantno primenjeni prokarbazin, lomustin i vinkristin nakon hirurškog odstranjivanja, usporavaju progresiju bolesti (van den Bent i sar., 2006).

Ćelije glioblastoma karakteriše ekstremna rezistencija na hemioterapiju. Glavno ograničenje za efikasan tretman hidrofobnom lekovima, kao što je PTX, je slaba propustljivost krvno-moždane barijere (Breedveld i saradnici, 2006). Do sada su proučavani različiti pristupi za dopremanje PTX-a do mozga, od konjugacije leka sa peptidima (Régina i saradnici, 2008), do dopremanja leka u nanopartikulama (Nikanjam i saradnici, 2007). Takođe su razmatrani i pristupi u terapiji glioma koji podrazumevaju administraciju PTX-a sa različitim inhibitorima P-gp-a (Fellner i saradnici, 2002).

1.4. VIŠESTRUKA REZISTENCIJA – POJAM I MEHANIZMI

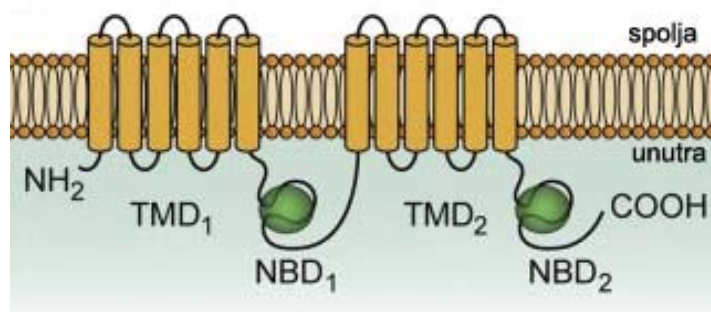
Glavni uzrok neuspeha hemioterapije u lečenju kancera je pojava rezistencije. Do pojave rezistencije tumora na citostatike može doći usled poremećaja u farmakokinetici leka (npr. nemogućnost leka da dopre do ćelija tumora u aktivnoj formi ili koncentraciji kritičnoj za postizanje efekta) ili neadekvatnog odgovora tumorskih ćelija na terapiju. Rezistencija na veći broj strukturno i funkcionalno različitih hemioterapeutika se definiše kao višestruka (engl. „multi-drug“) rezistencija (MDR). MDR može biti prisutna pre primene hemioterapije (urođena ili *de novo* rezistencija) ili se može razviti u toku hemioterapije (stečena rezistencija). Prisustvo genomske nestabilnosti kod kancer ćelija dovodi do promena u brojnim molekularnim procesima. Neke od tih promena daju adaptivnu prednost pojedinim ćelijama u prisustvu citostatika. One uspešno prolaze kroz proces selekcije, umnožavaju se i formiraju dominantnu populaciju rezistentnih ćelija (Stavrovskaya, 2000). MDR fenotip može nastati usled strukturnih i funkcionalnih promena na plazma membrani, unutar ćelijskih organela, citoplazme i jedra. Smanjena akumulacija terapeutika u ćeliji, modifikacije detoksifikacionog sistema, promene u ciljnim molekulima, brza popravka oštećenja DNK, kao i izbegavanje apoptoze, predstavljaju mehanizme koji pojedinačno ili uzajamno doprinose pojavi MDR fenotipa (Longley i Johnston, 2005).

Smanjena unutarćelijska akumulacija lekova može nastati smanjenim ulaskom, kao i povećanim izbacivanjem terapeutika iz ćelije. Obzirom da većina lekova ulazi u ćeliju pasivnom difuzijom preko plazma membrane, promene u strukturi ćelijske membrane mogu dovesti do smanjenog ulaska lekova u ćeliju. Ipak, glavni mehanizam koji dovodi do smanjene unutarćelijske akumulacije terapeutika je povećano izbacivanje iz ćelije pomoću membranskih transportera P-glikoproteina (P-gp) i proteina povezanog sa nastankom MDR (MRP) (Gottesman i saradnici, 2002).

1.4.1. P-glikoprotein

Najpodrobnije proučen mehanizam ćelijske rezistencije koji utiče na sposobnost leka da proдре u ćeliju i dopre do ciljnog molekula je mehanizam izbacivanja leka iz ćelije pomoću membranskog P-glikoproteina (P-gp, MDR1, ABCB1). P-gp pripada familiji ATP vezujućih (ABC) transportera i u normalnim uslovima prisutan je u

različitim tkivima: u bubrezima, jetri, tankom i debelom crevu, pankreasu, placenti, materici, kao i endotelijalnim ćelijama kapilara testisa i krvno-moždane barijere. P-gp je eksprimiran na apikalnoj površini ćelije i njegova glavna fiziološka uloga je zaštita vitalnih organa i fetusa od delovanja ksenobiotika (Fung KL i Gottesman, 2009). Ovaj protein se sastoji od dva identična dela i svaki od njih sadrži šest hidrofobnih, transmembranskih segmenata na koje se nadovezuju hidrofilni ATP vezujući domeni, koji su locirani u citoplazmi (Slika 3). ATP vezujući domeni funkcionišu kao ATPaze koje hidrolizuju ATP u ADP. Pretpostavlja se da P-gp funkcionišu kao hidrofobna vakumska pumpa u kojoj P-gp direktno interaguje sa supstratom i uz pomoć hidrolize ATP-a obezbeđuje njegov transport van ćelije kroz membranu (Sarkadi i saradnici, 2006). Jedna od glavnih karakteristika P-gp-a je njegova široka supstratna specifičnost. Njegovi supstrati imaju različite hemijske strukture i širok spektar bioloških aktivnosti kao što su antikancer agensi, antihistaminici, blokatori kalcijumovih kanala, antibiotici. Zbog toga su većina citostatika supstrati za P-gp: antraciklini, takseni, *vinca* alkaloidi, epipodofilotoksini. Upravo iz tog razloga ekspresija P-gp-a određuje stepen rezistencije na ove antikancer agense (Fung KL i Gottesman, 2009).



Slika 3. P-gp (ABCB1 tip transportera)
(preuzeto i modifikovano od Sarkadi i saradnika, 2006)

Gen koji kodira P-gp, *mdr1*, se nalazi na hromozomu 7 i ima 29 egzona. Promotorski region ovog gena ne poseduje TATA element, ali sadrži invertovani CCAAT element koji interaguje sa NF-Y i YB-1 transkripcionim faktorima, kao i GC element koji interaguje sa članovima Sp familije transkripcionih faktora, pogotovo sa Sp1 i Sp3. Ova dva elementa su odgovorna za konstitutivnu ekspresiju *mdr1* gena. Takođe, promene koje dovode do maligne transformacije, kao što su aktivacija onkogena i inaktivacija tumor supresora, dovode do konstitutivne ekspresije *mdr1*

gena. Zbog toga je visok nivo ekspresije P-gp često prisutan i pre primene hemioterapije, čak i kod kancer ćelija koje ne potiču od tkiva koje normalno ekspresiraju P-gp. Tako na primer, aktivacija Ras/MEK/ERK signalnog puta dovodi do povećanog vezivanja Sp1 i Sp3 transkripcionih faktora za GC element i povećane transkripcije *mdr1* gena (Scotto, 2003). Takođe, aktivacijom ovog signalnog puta dolazi do fosforilacije i translokacije YB-1 transkripcionog faktora u jedro ćelije i povećane ekspresije P-gp (Shen i saradnici, 2011). p53 tumor supresor sprečava transkripciju *mdr1* gena direktnom interakcijom sa HT (engl. „head to tail“) elementom koji se nalazi u okviru promotora ovog gena. Gubitak inhibitorne funkcije ovog proteina usled prisustva mutacija u *p53* genu povećava ekspresiju P-gp. Međutim, mutirani p53 protein može i da aktivira ekspresiju *mdr1* gena preko interakcije sa Ets-1 transkripcionim faktorom za koji postoji vezujuće mesto u okviru promotora ovog gena. Pored bazalnog nivoa, ekspresija *mdr1* gena može biti indukovana različitim sredinskim faktorima kao što su hipoksija, zračenje, citokini, citostatici (Scotto, 2003). Pri tretmanu citostaticima, povećana ekspresija P-gp-a nastaje zbog povećane transkripcije *mdr1* gena, ali i zbog amplifikacije ovog gena (najčešće u kulturi ćelija) (Stavrovskaya, 2000).

Iako je *mdr1* gen visoko konzerviran, u humanoj populaciji je otkriveno prisustvo više od 50 pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (SNP) u kodirajućem regionu *mdr1* gena. Većina ovih polimorfizama se nalaze u delu gena koji kodiraju unutarćelijski region P-gp. Prisustvo polimorfizama može da menja kako ekspresiju P-gp, tako i njegovu konformaciju i aktivnost. Nekoliko SNP su često zastupljeni u *mdr1* genu, što ukazuje na njihov značaj u evoluciji ovog gena. Najčešće zastupljeni polimorfizam je na poziciji 3435C>T u okviru egzona 26. Ovaj polimorfizam dovodi do promene citozina u timin i zamene ATC kodona u ATT. Ovo je sinonimna mutacija zato što oba kodona kodiraju izoleucin koji se nalazi u okviru drugog ATP-vezujućeg domena P-gp. Važna karakteristika ovog polimorfizma je da učestalost alela varira kod različitih humanih populacija. C alel je više zastupljen nego T alel i zbog toga je on „wild-type“. Neka istraživanja su pokazala da prisustvo homozigota za T alel dovodi do smanjene ekspresije P-gp u tankom crevu (Fung KL i Gottesman, 2009). Međutim, ćelijske linije sa 3435C>T polimorfizmom u *mdr1* genu nemaju smanjenu ekspresiju P-gp, ali pokazuju promenjen afinitet za određene supstrate. Postavlja se pitanje kako sinonimna mutacija koja ne menja amino-kiselinsku sekvencu proteina utiče na njegovu ekspresiju, kao i na njegovu supstratnu specifičnost. Pretpostavlja se da je

razlog to što ovaj polimorfizam dovodi do zamene kodona (ATC u ATT) i upotrebe nove vrste transportne RNK (tRNK) koja je manje zastupljena u ćeliji. Ovo može da utiče na kinetiku translacije, dinamiku pakovanja, kao i zauzimanja konformacije P-gp, što može dovesti do promene strukture vezujućeg mesta kako za supstrate, tako i za inhibitore (Kimchi-Sarfaty i saradnici, 2007).

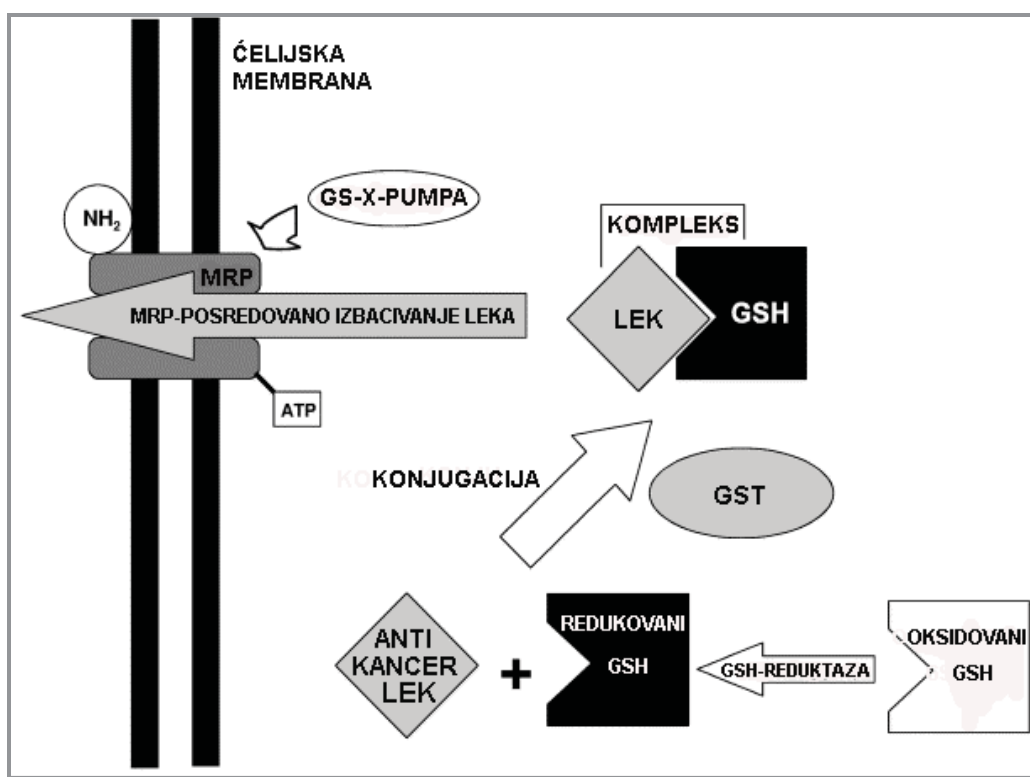
1.4.2. MRP

Članovi MRP grupe transmembranskih glikoproteina iz familije ABC transportera su fiziološki prisutani u mnogim tkivima (skeletni mišići, pluća, testisi, bubreg, krvne ćelije) gde obavljaju različite funkcije: od zaštitne uloge u oksidativnom stresu, preko izbacivanja citotoksičnih supstanci, do učešća u inflamatornom odgovoru. Glavni predstavnik MRP transportera, uključen u razvoj MDR fenotipa kod tumorskih ćelija je MRP1 (Bredel, 2001). Pored strukture karakteristične za ABCB transportere (po šest transmembranskih segmenata na koje se nadovezuju citoplazmatski ATP vezujući domeni), MRP1 na proksimalnom kraju ima još pet transmembranskih segmenata sa NH₂-završetkom koji se nalazi sa spoljašnje strane ćelijske membrane. MRP1 ima sličnu supstratnu specifičnost kao i P-gp i doprinosi rezistenciji tumora na antracikline, epipodofilotoksine, *vinca* alkaloida. Međutim, za njegovu aktivnost je neophodno prisustvo ćelijskog glutaciona. Ovaj membranski glikoprotein je jedan od članova glutation eksportnih pumpi koji transportuju konjugate leka sa glutationom. Zbog toga je MRP1, za razliku od P-gp, sposoban da transportuje i terapeutike koji podležu detoksifikaciji glutationom kao što su alkilirajući agensi (Leslie i saradnici, 2005).

1.4.3. Glutationski detoksifikacioni sistem

Glutationski detoksifikacioni sistem igra glavnu ulogu u zaštiti ćelija od oštećenja izazvanih oksidativnim stresom, ali i oštećenja izazvanih delovanjem različitih antikancer agenasa. Ovaj sistem se sastoji od glutaciona (GSH), enzima uključenih u sintezu GSH, glutation-S-transferaza (GST) i glutation eksportnih proteina (GS-X pumpi) (Bredel, 2001). GSH je neproteinski tiol, koji se u ćeliji dominantno nalazi u redukovanoj formi ali može biti i u oksidovanom stanju kao glutation disulfid (GSSG). GSSG nastaje ili spontano pri interakciji sa slobodnim radikalima ili

delovanjem enzima GSH peroksidaze, tj. usled eliminacije slobodnih radikala i redukcije peroksida u ćeliji. Reverzna reakcija prevođenja oksidovane forme glutationa u redukovanu je katalizovana enzimom glutation reduktazom u prisustvu NADPH (Kearns i Hall, 1999). GSH takođe interaguje sa različitim antikancer azenasima, što dovodi do stvaranja manje toksičnog i više rastvorljivog konjugata. Ovu reakciju katalizuje enzim glutation-S-transferaza. Nastali konjugati se izbacuju iz ćelije aktivnim transportom pomoću GS-X pumpi (uključujući i MRP1). Upravo iz tog razloga promene u okviru glutationskog detoksifikacionog sistema mogu dovesti do pojave rezistencije na različite citostatike (Slika 4) (Bredel, 2001).



Slika 4. Glutationski detoksifikacioni sistem. GST dovodi do konjugacije GSH sa antikancer azenasom što dovodi do stvaranja manje toksičnog i više rastvorljivog konjugata. Nastali konjugati se izbacuju iz ćelije aktivnim transportom pomoću GS-X pumpi, u koje spadaju i MRP transporteri (preuzeto i modifikovano od Bredel, 2001).

GST predstavljaju familiju ćelijskih enzima koji su rasprostranjeni u citoplazmi i mikrozomima. Citoplazmatska grupa je podeljena na šest izoformi: α , μ , ω , π , θ i ζ . GST- π izoforma je odgovorna za stvaranje konjugata GSH-citostatik i njihovu eliminaciju iz ćelije. Zbog toga prekomerna ekspresija GST- π dovodi do pojave rezistencije na citostatike koji su supstrati za ovaj enzim kao što su jedinjenja platine i

alkilirajući agensi. Povišen nivo GSH u ćeliji, kao i povećana ekspresija enzima uključenih u sintezu GSH (γ -glutamilstein sintetaza i γ -glutamilttransferaza) mogu takođe biti uzrok pojave rezistencije (Stavrovskaya, 2000). S druge strane, GST- π izoforma inhibira c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK), koja je uključena u odgovor ćelije na stres pokretanjem apoptoze. U normalnim uslovima, JNK ima nisku aktivnost zbog postojanja inhibitorynog kompleksa GST- π :JNK. U uslovima oksidativnog stresa (npr. prilikom delovanja citostatika) dolazi do disocijacije GST- π :JNK kompleksa, oligomerizacije GST- π i pokretanja apoptoze. Međutim, kada je GST- π prekomerno eksprimiran, JNK je pod inhibicijom i ćelija je sprečena da uđe u apoptozu nakon delovanja citostatika. Na ovaj način se ostvaruje rezistencija i na antikancer agense koji nisu direktni supstrati za GST- π kao što su antraciklini, takseni i *vinca* alkaloidi (Townsend i Tew, 2003).

1.4.4. Izbegavanje apoptoze

Poznato je da većina citostatika, bez obzira na njihove različite ciljane molekule u ćeliji, ostvaruje svoj citotoksični efekat pokretanjem apoptoze. Zbog toga svaka promena u molekulima koji učestvuju u apoptotskom putu može sprečiti umiranje kancer ćelija i na taj način dovesti do razvika rezistencije (Longley i Johnston, 2005). Jedan od ključnih regulatornih molekula u ovom procesu je p53 protein. Nakon oštećenja ćelije, p53 tumor supresor dovodi do privremenog zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 ili G2 fazi ili uvodi ćeliju u apoptozu. Većina mutacija u *p53* genu narušavaju funkciju p53 proteina koji više nije u mogućnosti da zaustavi ćelijski ciklus, niti da pokrene apoptozu. Zbog toga nefunkcionalni p53 protein menja senzitivnost kancer ćelija na terapeutike, dovodeći do nastanka rezistentnog fenotipa (Ferreira i saradnici, 1999).

Kao što je već rečeno, regulacija procesa apoptoze zavisi i od finog balansa između pro- i anti-apoptoskih članova Bcl-2 familije proteina. Negativna regulacija pro-apoptotskih gena, kao i pozitivna regulacija anti-apoptotskih gena Bcl-2 familije doprinosi smanjenju citotoksičnog efekta većine terapeutika (Longley i Johnston, 2005).

Aktivacija nekih signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji procesa preživljavanja takođe mogu sprečiti pokretanje apoptoze i dovesti do razvoja rezistentnog fenotipa. PI3K/Akt signalni put je uključen u preživljavanje ćelije tako što

inhibira pro-apoptotski protein Bad, kao i FOXO transkripcione faktore, koji regulišu transkripciju pro-apoptotskih proteina FasL i Bim. Ovaj signalni put takođe povećava transkripciju anti-apoptotskih gena Bcl-2 i Bcl-XL (Stephens i saradnici, 2005). Zbog toga, inaktivacija PTEN tumor supresora, ključnog negativnog regulatora PI3K/Akt signalnog puta, dovodi do pojave kancera, ali i do nastanka hemio-rezistencije kod već postojećih kancer ćelija (McCubrey i saradnici, 2007).

1.4.5. Paklitaksel – mehanizam delovanja i razvoj rezistencije



Slika 5. Paklitaksel-vezujuće mesto.

Paklitaksel se vezuje za unutrašnju stranu mikrotubula za paklitaksel-vezujuće mesto i suprimira njihovu dinamiku (preuzeto i modifikovano od McGrogan i saradnika, 2008).

Paklitaksel (Taksol) pripada familiji taksana i prvi put je izolovan iz kore pacifičke tise, *Taxus brevifolia*, 1971 godine (Wani i saradnici, 1971). To je antitumorski agens koji se koristi u lečenju brojnih maligniteta, uključujući tumore jajnika, dojke, glave i vrata, pluća i prostate. Neurotoksičnost, reakcije preosetljivosti, hematotoksičnost i kardiotoksičnost su uobičajeni neželjeni efekti koji se javljaju prilikom terapije paklitakselom (Rowinsky & Donehower, 1995).

Paklitaksel je antimitotski agens koji se vezuje za mikrotubule deobnog vretena i sprečava njihovu

depolimerizaciju (Slika 5), što ometa normalno odvijanje ćelijske deobe (Kavallaris i saradnici, 1997). Mikrotubule su šuplje, cilindrične cevi koji se sastoje od α i β heterodimera. Ovi heterodimeri se spajaju da bi formirali linearne protofilamente i 13

bočno povezanih protofilamenata čine mikrotubule. Mikrotubule imaju važnu ulogu u brojnim ćelijskim aktivnostima kao što su održavanje oblika ćelije, pokretljivost, unutarćelijski transport i formiranje deobog vretena tokom ćelijske deobe (Galletti i saradnici, 2007). To su visoko dinamične stukture koje kontinuirano polimerizuju i depolimerizuju. α i β heterodimeri se ugrađuju u mikrotubule, pa depolimerizuju, odnosno oslobađaju u citoplazmu (Orr i saradnici, 2003). Dinamička nestabilnost je regulisana brojnim proteinima udruženim sa mikrotubulama koji se vezuju i stabilizuju mikrotubule. MAP proteini se sastoje od nekoliko podtipova: MAP1A, MAP1B, MAP2, MAP4 i tau. Fosforilacija MAP je važna post-translaciona modifikacija koja utiče na njihovo odvajanje, dovodeći do destabilizacije mikrotubula (Honore i saradnici, 2005). Onkoprotein 18/statmin je još jedan protein koji utiče na stabilnost mikrotubula. Statmin reguliše mikrotubule deobnog vretena tako što se vezuje za krajeve mikrotubula povećavajući njihovu depolimerizaciju (Cassimeris, 2002).

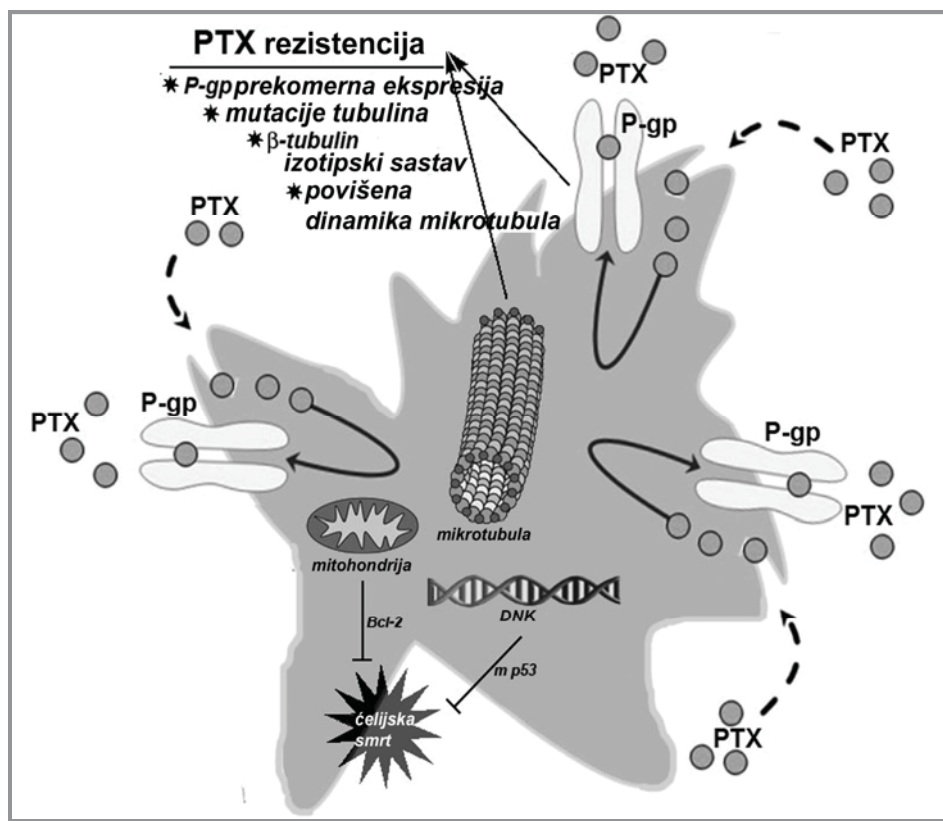
Ciljni molekul za paklitaksel je β tubulin, pri čemu taksan-vezujuće mesto postoji samo na polimerizovanim mikrotubulama. Svoj citotoksični efekat paklitaksel ostvaruje vezivanjem za mikrotubule deobnog vretena i sprečavanjem njihove depolimerizacije, što izaziva zaustavljanje ćelije u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Derry i saradnici, 1995). Ovo dovodi do pokretanja JNK/SAPK signalnog puta. JNK fosforiliše i inhibira anti-apoptotski protein Bcl-2, što predstavlja signal za pokretanje apoptoze (Wang i saradnici, 1998).

Ipak, postoji nekoliko različitih ishoda nakon izlaganja ćelije paklitakselu. Prvo, ćelije se zaustavljaju u G2/M fazi ćelijskog ciklusa sve dok se paklitaksel ne ukloni. Ovo omogućava ćelijama da prežive i nastave da se dele kao diploidne (2N) ćelije (Weaver & Cleveland, 2005). Nasuprot tome, može da se desi proklizavanje u ćelijskoj deobi (engl. „mitotic slippage”) ili adaptacija, kada ćelije završavaju deobu bez anafaze i telofaze, pri čemu nastaju tetraploidne (4N) ćelije kod kojih nije došlo do razdvajanja hromozoma (Rieder & Maiato, 2004). Ove ćelije mogu da prežive i nastave da se dele kao tetraploidne (4N) ćelije (Adaptacija I). Nasuprot tome, adaptirane ćelije mogu da napuste G1 fazu ćelijskog ciklusa, ulazeći u stanje mirovanja ili apoptozu (Adaptacija II). Takođe, ćelije mogu da izbegnu kontrolni sistem G1 faze ćelijskog ciklusa, što dovodi do apoptoze u interfazi (Adaptacija III). Konačno, apoptoza može da se pokrene odmah nakon zaustavljanja ćelije u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Blagosklonny, 2007).

Bez obzira na značajan uspeh paklitaksela kao antitumorskog agensa, razvoj rezistencije predstavlja glavno ograničenje u korišćenju ovog agensa u terapiji

maliginiteta. Brojni faktori utiču na razvoj rezistencije na paklitaksel uključujući mutacije u α i β tubulinu, promene u sastavu izoformi β tubulina, povećanu ekspresiju P-gp i promene u ekspresiji MAP. Takođe, narušavanje normalnog funkcionisanja nekih signalnih puteva kao što su kontrola ćelijskog ciklusa, rast ćelije i apoptoza mogu imati važnu ulogu u nastanku rezistencije na paklitaksel (Slika 6).

Kod ljudi postoji 7 različitih izoformi β tubulina (klasa I, II III, IVa, IVb, V I VI), čija se ekspresija razlikuje između tkiva. Izoforme tubulina β I i β IVa su konstitutivno eksprimirane, dok je ekspresija ostalih izoformi tkivno specifična (Berrieman i saradnici, 2004). Neka istraživanja pokazuju da su mikrotubule sastavljene od α/β III heterodimera mnogo manje stabilne sa povećanom tendencijom ka depolimerizaciji u odnosu na mikrotubule sastavljene od drugih izoformi β tubulina (Galletti i saradnici, 2007; Orr i saradnici, 2003). Pored toga, postoje dokazi da su mikrotubule sastavljene od α/β III ili α/β IV heterodimera manje senzitivne na delovanje paklitaksela, odnosno potrebna je veća količina vezanog paklitaksela da bi došlo do stabilizacije mikrotubula (Galletti i saradnici, 2007; Orr i saradnici, 2003). Ova istraživanja pokazuju da efekat paklitaksela zavisi od sastava izoformi β tubulina, pri čemu povećana ekspresija β III i β IV tubulina dovodi do razvoja rezistencije na paklitaksel.



Slika 6. Mehanizmi rezistencije na paklitaksel (PTX). PTX je supstrat za P-gp transporter. Pored toga, izlaganje PTX-u može indukovati prekomernu ekspresiju P-gp-a kod tumorskih ćelija i dovesti do razvoja MDR-a. Promene u PTX ciljnom molekulu - β -tubulinu, kao što su mutacije ili dominantna ekspresija određenih izotipova obično doprinose rezistenciji na PTX. Takođe, rezistencija na apoptozu zbog prekomerne ekspresije anti-apoptotskih faktora (Bcl-2) ili inaktivacije tumor supresora p53 može smanjiti efikasnost PTX-a.

Većina tubulinskih mutacija identifikovana je u β I izoformi tubulina. Mutacije u β tubulinu menjaju dinamiku mikrotubula i/ili utiču na vezujuće mesto za paklitaksel dovodeći do nastanka rezistencije (Berrieman i saradnici, 2004). Takođe, mutacije u β tubulinu su često praćene gubitkom heterozigotnosti (eng. LOH) normalnog alela tubulina nakon dugotrajnog izlaganja paklitakselu, što dovodi do nastanka veoma rezistentnog fenotipa (Wang i saradnici, 2005). U manjoj meri rezistencija na paklitaksel je povezana su mutacijama u α tubulinu koje utiču na vezivanje MAP za mikrotubule (Martello i saradnici, 2003).

Tau, jedan od subtipova MAP, omogućava povezivanje tubulinskih heterodimera i stabilizaciju mikrotubula (Wagner i saradnici, 2005). Ovaj protein se vezuje za paklitaksel-vezujuće mesto na unutrašnjoj strani mikrotubula. Postoje dokazi o sprezi povišene ekspresije tau i rezistencije na paklitaksel zato što sklapanje

mikrotubula u prisustvu niskih koncentracija tau omogućava znatno brže vezivanje paklitaksela u odnosu na prisustvo visokih koncentracija tau (Rouzier i saradnici, 2005). Onkoprotein 18/statmin je uključen u regulaciju deobnog vretena tako što se vezuje za krajeve deobnog vretena i dovodi do depolimerizacije mikrotubula. Zbog toga prekomerna ekspresija statmina smanjuje polimerizaciju mikrotubula deobnog vretena i dovodi do smanjenog vezivanja paklitaksela, utiči na njegovu efikasnost.

p53 tumor supresor ima glavnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze. Međutim, njegova uloga u nastanku rezistencije na paklitaksel je još uvek nejasna. Neka istraživanja pokazuju povećanu senzitivnost tumora sa mutiranim p53 na paklitaksel (Hawkins i saradnici, 1996). Naime, mutirani p53 povećava ekspresiju MAP4, koji utiče na polimerizaciju mikrotubula povećavajući senzitivnost na paklitaksel (Zhang i saradnici, 1998). Takođe, mutirani p53 može da izbegne kontrolni sistem G1 faze ćelijskog ciklusa, što uvodi ćeliju znatno brže u G2/M fazu ćelijskog ciklusa, gde paklitaksel ispoljava svoje dejstvo (Wang i saradnici, 2000). Nasuprot ovim istraživanjima, postoje dokazi o sprezi mutiranog p53 i rezistencije na paklitaksel. Mutirani p53 ne može da utiče na ekspresiju pro-apoptotskog Bax-a, što sprečava pokretanje apoptoze i može dovesti do smanjene efikasnosti paklitaksela (Strobel i saradnici, 1998).

PI3K/Akt signalni put igra ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog preživljavanja, rasta ćelije i progresiji ćelijskog ciklusa. Ovaj signalni put je često prekomerno aktiviran u malignim tumorima, dovodeći do smanjene senzitivnosti tumora na paklitaksel (Clark i saradnici, 2002). PTEN tumor supresor je glavni negativni regulator ovog signalnog puta. Gubitak aktivnosti PTEN-a aktivira PI3K/Akt signalni put, što dovodi do povećanog preživljavanja tumorskih ćelija i nastanka rezistencije na paklitaksel (Priulla i saradnici, 2007).

1.5. PREVAZILAŽENJE VIŠESTRUKRE REZISENCIJE

Obzirom da MDR predstavlja jednu od glavnih prepreka za uspešno lečenje kancera, neophodno je proučavanje mehanizama koji dovode do nastanka MDR fenotipa u cilju razvoja supstanci koje mogu uspešno prevazići MDR i učiniti kancer ćelije ponovo osetljivim na delovanje konvencionalnih citostatika. Veliki broj studija o rezistenciji na hemioterapiju istražuje razvoj rezistencije pomoću ćelijskih linija

nastalih u laboratoriji dugotrajnim izlaganjem rastućim koncentracijama antitumorskih lekova. Iako ovako nastali *in vitro* modeli ne odgovaraju u potpunosti situaciji *in vivo*, gde pacijenti primaju terapiju u ciklusima svake 3 do 4 nedelje, veoma je značajan njihov doprinos proučavanju mehanizama i mogućnostima reverzije rezistencije.

Postoji nekoliko strategija za reverziju MDR fenotipa. Jedan od najčešćih pristupa za prevazilaženje MDR-a je primena kombinovane terapije antitumorskog agensa sa inhibitorima MDR transportera. Idealan modulator MDR transportera bi trebalo da spreči izbacivanje antitumorskog agensa iz ćelije, poveća njegovu unutarćelijsku akumulaciju i na taj način poveća hemosenzitivnost rezistentnih tumorskih ćelija. Predloženo je nekoliko mehanizama kojim modulatori mogu da inhibiraju MDR transportere: vezivanjem direktno za supstrat-vezujuće mesto na ABC transporteru i sprečavanjem transporta na kompetitivni i nekompetitivni način, sprečavanjem vezivanja ATP-a za protein i inhibiranjem ATP hidrolize (Amdudkar i saradnici, 1999). U poslednje dve decenije identifikovano je hiljade inhibitora P-gp-a. Njihova strukturna raznovrsnost je slična strukturnoj raznovrsnosti supstrata P-gp transportera. P-gp inhibitori su podeljeni u tri generacije u zavisnosti od njihovog hronološkog nastanka i specifičnosti i/ili afiniteta ka P-gp-u (Varma i saradnici, 2003).

Prvu generaciju P-gp inhibitora čine farmakološka jedinjenja koja se koriste za druge indikacije, ali za koje je pokazano da inhibiraju P-gp. Tu spadaju blokatori kalcijumovih kanala kao što je verapamil; imunosupresivna jedinjenja poput ciklosporina A; anti-hipertenzivi rezerpin, kvanidin i johimbin; i antiestrogeni kao što je tamoksifen (Varma i saradnici, 2003). Prva generacija inhibitora je manje potentna, neselektivna i toksična zbog visoke koncentracije neophodne za inhibiciju P-gp-a. Naime, brojni inhibitori prve generacije su i sami supstrati za P-gp i nalaze se u kompeticiji sa primenjenim antitumorskim agensom za izbacivanje iz ćelije. Zbog toga je neophodna visoka koncentracija inhibitora u serumu da bi se postigla dovoljna unutarćelijska koncentracija neophodna za inhibiciju P-gp-a (Dantzig i saradnici, 2003).

Druga generacija inhibitora se sastoji od jedinjenja koja nemaju farmakološku aktivnost prve generacije i imaju veći afinitet za P-gp. U ovu kategoriju spadaju agensi kao što su valspodar (neimunosupresivni analog ciklosporina A), deksverapamil (R-izomer verapamila koji nema negativne efekte na srce) i birikodar (Varma i saradnici, 2003; Dantzig i saradnici, 2003). Iako su ova jedinjenja napravljena da bi imala manju toksičnost, ona su ipak zadržala neke karakteristike koje ograničavaju njihovu kliničku

upotrebu. Afinitet ove generacije inhibitora ka P-gp-u je suviše mali da bi produkovali značajnu inhibiciju *in vivo* u opsegu tolerabilnih doza. Takođe, inhibicija drugih transportera koji nisu ciljni molekuli za ova jedinjenja značajno povećavaju neželjene efekte (Ozben, 2006). Ova jedinjenja su supstrati za citohrom P-450 (CYP) i nalaze se u kompeticiji sa antitumorskim lekom za CYP-posredovanu oksidativnu reakciju. Na ovaj način inhibicija metabolizma primenjenog hemioterapeutika dovodi do intoksikacije pacijenta (Kang i saradnici, 2001).

Treća generacija inhibitora je napravljena sa ciljem da se što više poveća specifičnost ka P-gp-u i da se značajno smanji toksičnost. Inhibitori kao što su tarikevidar (XR9576), LY335979 i OC144093 su moćni selektivni inhibitori P-gp-a (aktivni u nanomolarnom opsegu), koji imaju 10 puta veću moć inhibicije nego modulatori prve i druge generacije (Krishna & Mayer, 2000). Međutim, neka od ovih jedinjenja su zaustavljena u III fazi kliničkih istraživanja zbog toksičnosti. Do sada nisu dobijeni zadovoljavajući rezultati u kliničkim ispitivanjima inhibitora P-gp-a. Glavno ograničenje predstavljaju neadekvatan izbor pacijenata (npr. pacijenti bez dokazanog prisustva MDR-a) i problemi u dijagnostici kliničkog MDR-a. Drugi mogući razlozi su prisustvo drugih mehanizama rezistencije, kao i empirijsko smanjenje doze primenjenog inhibitora (Gottesman i saradnici, 2002). Takođe, prisustvo pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (SNP) u *mdr1* genu može uticati na smanjenu efikasnost P-gp inhibitora (Lepper i saradnici, 2005).

Sve dosadašnje strategije za reverziju MDR-a su ograničenog potencijala, pa je potraga za novim supstancama i dalje aktuelna. Jedinjenja koja u zadnje vreme privlače veliku pažnju kao potencijalni modulatori P-gp-a su jedinjenja izolovana iz biljaka (Zhou i saradnici, 2004, Deferme i saradnici, 2002). Ova jedinjenja predstavljaju idealne inhibitore P-gp-a zbog toga što su netoksična i što nemaju sopstvenu farmakološku aktivnost. Zbog toga se ulažu veliki naponi da se identifikuju prirodna jedinjenja izolovana iz biljaka koja inhibiraju P-gp, prevazilaze MDR fenotip i povećavaju senzitivnost tumorskih ćelija na klasične hemioterapeutike bez značajnih toksikoloških efekata (Zhou i saradnici, 2007).

Novi biološki agensi sa ciljanim dejstvom primenjeni samostalno ili u kombinaciji sa standardnom hemioterapijom, pružaju bolje terapijske mogućnosti. U ova jedinjenja spadaju mali molekuli ili antitela koji deluju na PI3K/Akt signalni put kao što su inhibitori EGFR-a (cetuximab, gefitinib), erbB2 (trastuzumab, lapatinib),

mTOR-a (sirolimus, temsirolimus), jedinjenja koja deluju na tumorsku angiogenezu kao što su inhibitori VEGFR-a (bavacizumab, sunitinib) kao i jedinjenja koja deluju na neke druge tirozin kinaze npr. Bcr-Abl (imatinib, nilotinib). Pokazano je da neki tirozin kinazni inhibitori (TKI) mogu da inhibiraju ABC transportere, što dovodi do hemio-senzitizacije i povećane aktivnosti antitumorskih lekova. U zavisnosti od primenjene koncentracije neka od TKI jedinjenja se ponašaju, i kao supstrati, i kao inhibitori odgovarajućeg transportera. Pri nižim koncentracijama TKI se ponašaju kao supstrati i aktivno se izbacuju iz ćelije, dok pri višim koncentracijama inhibiraju transportere (Hegedus i saradnici, 2009). Brojne *in vitro* studije na različitim MDR ćelijskim linijama su pokazale da kombinovani tretman nekih TKI sa standardnim hemioterapeuticima značajno revertuju MDR fenotip (Tiwari i saradnici, 2009).

1.5.1. Strategije za prevazilaženje rezistencije na paklitaksel

Bez obzira na znažnu antitumorsku aktivnost, efikasnost paklitaksela je ograničena pojavom rezistencije. Bolje razumevanje mehanizama koji dovode do razvoja rezistencije na paklitaksel daje izuzetan doprinos u dizajniranju i otkrivanju novih jedinjenja koja stabilizuju mikrotubule i koja su efikasna na paklitaksel-rezistentnim kancer ćelijama. Tako je otkriće da neki novi, prirodni taksani imaju potencijal da inhibiraju P-gp stimulisalo potragu za novim prirodnim i sintetskim derivatima paklitaksela koji imaju sposobost reverzije MDR fenotipa (Shigemori i Kobayashi, 2004). Istraživanja veze između strukture i aktivnosti sintetskih taksana dovela je do dizajniranja taksana koji nisu supstrati za MDR transportere (druga i treća generacija taksana). Značajno veća aktivnost druge generacije taksana nego paklitaksela *in vitro*, pogotovo kod ćelija koje prkomerno ekspimiraju P-gp, ukazuje na značajan klinički potencijal ove generacije taksana (Botta i saradnici, 2007).

Epotiloni predstavljaju inhibitore mikrotubula prirodnog porekla koji se strukturno razlikuju od paklitaksela (Wartmann i Altmann, 2002). Jedna od glavnih karakteristika epotilona je da oni nisu supstrati P-gp transportera (Altmann i saradnici, 2000). Antitumorska aktivnost prirodnih epotilona, kao i sposobnost reverzije rezistencije dovala je do sintetisanja novih derivativa epotilona. Ovu familiju jedinjenja čine prirodni epotiloni A-F, kao i njihovi sintetski derivati iksabepilon, ZK-epotilon i KOS-1584. Mehanizmi koji dovode do razvoja rezistencije na paklitaksel kao što su prekomerna ekspresija P-gp, mutacije u β tubulinu i povećana ekspresija β III tubulina ne utiču na efikasnost iksabepilona (Rivera i Fomez, 2010).

Veoma značajan izvor jedinjenja koja stabilizuju mikrotubule su vođeni organizmi. Ova jedinjenja obuhvataju laulimalid, eleuterobin, diskodermolid, perolusid A i eribulin (Clark i saradnici, 2006; Long i saradnici, 1998; Martello i saradnici, 2001; Hood i saradnici, 2002; Cigler i Vahdat, 2010). Značajan potencijal pokazuju laulimalid i diskodermolid koji ne interaguju sa P-gp-om. Takođe, diskodermolid efikasno deluje na paklitaksel rezistentne kancer ćelije koje imaju mutacije u β tubulinu (Martello i saradnici, 2000).

Biljke roda *Euphorbia* (mlečika) predstavljaju značajan izvor makrocikličnih diterpena od kojih najveći potencijal pokazuju jatrofani. Skorašnja istraživanja su pokazala da jatrofani interagiju sa mikrotubulama na sličan način kao i paklitaksel (Miglietta i saradnici, 2003). Jatrofani predstavljaju novu klasu snažnih i specifičnih inhibitora P-gp-a i njihova efikasnost inhibicije P-gp-a je znatno veća nego ciklosporina A i verapamila (Vasas i saradnici, 2011).

Jedan od pristupa za prevazilaženje problema rezistencije na paklitaksel je i primena kombinovane terapije sa jedinjenjima koja inhibiraju signalne puteve za preživljavanje ili aktiviraju dodatne apoptotske signale. Primena inhibitora PI3K/Akt signalnog puta u kombinaciji sa paklitakselom značajno povećava efikasnost paklitaksela u tretmanu tumorskih ćelija (Hu i saradnici, 2002). Još jedan signalni put za preživljavanje čija inhibicija povećava senzitivnost tumorskih ćelija na paklitaksel je Raf/MEK/ERK signalni put (MacKeigan i saradnici, 2000). U strategiji koja podrazumeva kombinovani tretman ne samo da se povećava antitumorski efekat paklitaksela, već se i inhibira paklitakselom izazvana rezistencija, što doprinosi povoljnom terapijskom ishodu.

1.5.2. Jatrofani

Biljke roda *Euphorbia* (mlečika) su poznate još od antičkih vremena kao biljke koje se koriste u lečenju tumora i zbog toga su opisane u literaturi antičkih Grka i Rimljana (Ferreira i saradnici, 2005). *Euphorbia* sadrži jedinstven profil diterpenoidnih poliestara (ingenani, latirani, jatrofani, tigliani i dafnani) koji se često nalaze u kompleksnoj mešavini. Neka od ovih jedinjenja imaju značajne biološke karakteristike kao što su antibakterijske, antivirusne, antiproliferativne i citotoksične (Vasas i saradnici, 2011). Skorašnja istraživanja su pokazala da jatrofani izolovani iz roda *Euphorbia* predstavljaju novu klasu snažnih i specifičnih inhibitora P-gp-a (Corea

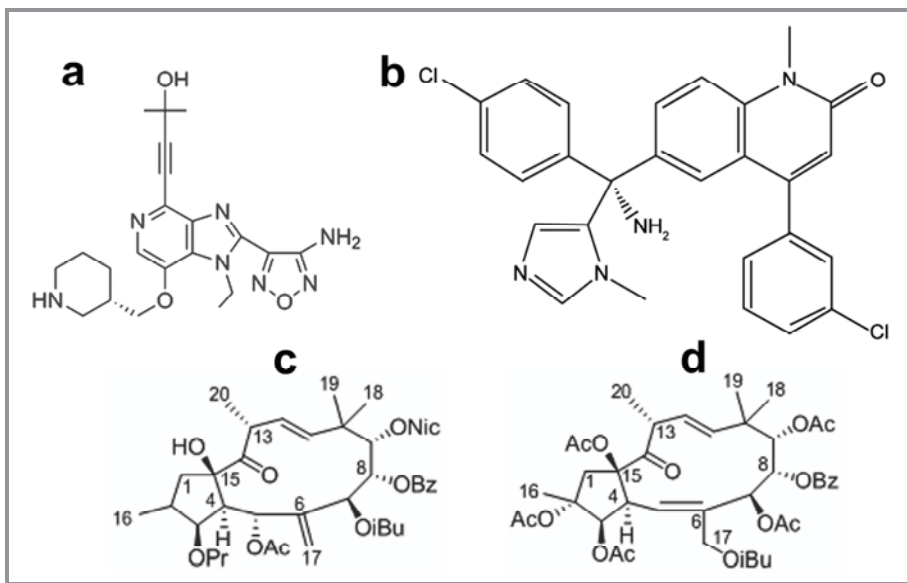
i saradnici, 2003). Brojni inhibitori su identifikovani među jatrofanima i njihova efikasnost inhibicije P-gp-a je znatno veća nego ciklosporina A i verapamila (Vasas i saradnici, 2011). Jatrofani takođe interaguju sa mikrotubulama na sličan način kao i paklitaksel, ali bez zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2/M fazi (Miglietta i saradnici, 2003).



Slika 7. *Euphorbia dendroides* L.

Euphorbia dendroides (drvenasta mlečika) je malo drvo rasprostranjeno u regionu Mediterana. Kao deo istraživanja mlečike poreklom iz jugoistočnog Balkana, izolovana je frakcija jatrofana poreklom iz *Euphorbia dendroides* (Slika 8c i d).

Antitumorska aktivnost jatrofana proučavana je na nekoliko različitih tumorskih linija (Aljancić i saradnici, 2011). Nasuprot prethodnim istraživanjima pokazano je da ovi jatrofani sprečavaju rast MDR tumorskih ćelija tako što izazivaju polimerizaciju tubulina, ali i zaustavljaju ćelijski ciklus u G2/M fazi (Pesic i saradnici, 2011). Takođe, ovi jatrofani se ponašaju kao moćni modulatori MDR fenotipa, smanjujući rezistenciju na paklitaksel i doksorubicin (Aljancić i saradnici, 2011; Pesic i saradnici, 2011).



Slika 8. Hemijske formule Akt inhibitora-GSK690693 (a), Tipifarniba (b), Eufodendrofana H (c) i Eufodendrofana S (d).

1.5.3. Akt inhibitor-GSK690693

GSK690693 (Slika 8a) je novi inhibitor Akt kinaza, koji pokazuje visoku selektivnost ka Akt 1, 2 i 3. Prvobitna istraživanja su pokazala snažnu antitumorsku aktivnost na nekoliko humanih, tumorskih ćelijskih linija. Takođe, ovo jedinjenje sprečava rast i izaziva apoptozu kod nekoliko ćelijskih linija akutne limfoblastne leukemije (Altomare i saradnici, 2010).

Familija Akt kinaza je glavni posrednik u regulaciji ćelijske deobe i preživljavanja. Tretman tumorskih ćelija sa GSK690693 inhibira Akt i dovodi do brojnih promena u nishodnim signalnim putevima. Akt direktno fosforiliše FOXO transkripcione faktore i na taj način ih izbacuje iz jedra i sprečava njihovu transkripcionu aktivnost (Brunet i saradnici, 2002). Zbog toga inhibicija Akt-a povećava aktivnost FOXO transkripcionih faktora. FOXO transkripcioni faktori direktno povećavaju ekspresiju inhibitora ćelijskog ciklusa kao što su HBP1, CCNG2 i CDKN1B (Kumar i saradnici, 2010).

Inhibicija Akt-a dovodi do smanjenje aktivnosti c-Myc transkripcionog faktora posredstvom nekoliko mehanizama. Nakon tretmana sa GSK690693 i inhibicije Akt-a, smanjuje se fosforilaciju GSK3 i povećava njegova kinaznu aktivnost. Aktivni GSK3 direktno fosforiliše c-Myc, što predstavlja signal za njegovu degradaciju (Rottmann i saradnici, 2005). Akt takođe fosforiliše mTOR, što povećava njegovu aktivnost. Aktivirani mTOR-a povećava aktivnost inicijalnog faktora translacije EIF4E koji direktno povećava translaciju c-Myc-a. Zbog toga tretman sa GSK690693 smanjuje aktivnost mTOR-a, što dovodi do smanjene količine c-Myc proteina u citoplazmi (Schmelzle & Hall, 2000). Takođe, aktivacija FOXO transkripcionih faktora sprečava transkripciju gena koji su regulisani c-Myc transkripcionim faktorom (Bouchard i saradnici, 2004).

Rb je protein koji reguliše ćelijski ciklus tako što sprečava prelaz ćelijskog ciklusa iz G1 u S fazu. Inhibicija Akt-a aktivira Rb i zaustavlja ćelijski ciklus preko nekoliko nezavisnih mehanizama. Jedan od njih je aktivacija inhibitora ćelijskog ciklusa CDKN1A i CDKN1B koji su negativno regulisani Akt posredovanom fosforilacijom (Liang & Slingerland, 2003). Bez obzira što su prvobitna istraživanja pokazala apoptotski efekat GSK690693 na nekim tumorskim ćelijskim linijama, ipak je njegov prvobidni mehanizam delovanja anti-proliferativni delovanjem na nekoliko

ćelijskih menahizama kao što je povećana aktivnost FOXO transkripcionih faktora, smanjenje aktivnosti c-Myc transkripcionog faktora i povećana aktivnost Rb proteina.

1.5.4. Ras inhibitor-Tipifarnib

Tipifarnib (Slika 8b) je kompetitivni inhibitor unutarćelijskog enzima farnezil transferaze, koji katalizuje prenos farnezil grupe na brojne supstrate uključujući Ras protein (Brunner i saradnici, 2003). Ras je mala GTPaza koja reguliše signalne puteve uključene u ćelijsku deobu i preživljavanje kao što su MAPK/ERK i PI3K/Akt. Farnezil transferaza katalizuje prenos farnezil grupe na ciljnu peptidnu sekvencu „CAAX” koja se nalazi na C-terminalnom kraju Ras proteina (Basso i saradnici, 2006). Tipifarnib remeti aktivnost Ras proteina tako što sprečava vezivanje farnezil grupe, koji omogućava njegovo kretanje iz citoplazme i vezivanje za plazma membranu (Santucci i saradnici, 2003). Pored inhibicije farnezil transferaze tipifarnib inhibira i aktivnost P-gp-a (Medeiros i saradnici, 2007).

Brojna istraživanja su pokazala antiproliferativni, antiangiogeni i proapoptotski efekat tipifarniba *in vitro* i *in vivo*. Takođe, tipifarnib je dao značajne rezultate u tretmanu akutne mijeloidne leukemije i mijelodisplastičnog sindroma. Efikasnost tipifarniba u tretmanu solidnih tumora se intenzivno istražuje, pogotovo u tretmanu tumora dojke u kombinaciji sa paklitakselom ili endokrinom terapijom (Armand i saradnici, 2007).

2. CILJEVI

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje uloge paklitaksela u razvoju rezistencije kod karcinoma debelog creva (DLD1 ćelijska linija) i glioblastoma (U87 ćelijska linija), kao i uticaj paklitaksela na mehanizme uključene u kancerogenezu radi utvrđivanja prednosti i mana terapije paklitakselom kod pomenutih tumora. U tom smislu, postavljeni su sledeći zadaci:

- *Indukovati rezistenciju kod DLD1 i U87 ćelijskih linija postepenim kontinuiranim tretmanom paklitakselom*
- *Utvrditi prisustvo višestruke rezistencije na veći broj strukturno i funkcionalno nesrodnih hemioterapeutika tj. prisustvo MDR fenotipa kod novouspostavljenih DLD1-TxR i U87-TxR ćelija*
- *Ispitati ekspresiju MDR gena na nivou iRNK radi utvrđivanja njihovog doprinosa razvijenoj rezistenciji*
- *Ispitati proteinsku ekspresiju i aktivnost P-glikoproteina posredstvom akumulacije njegovih supstrata rodamina 123 i doksorubicina*
- *Utvrditi doprinos glutationskog sistema u razvoju MDR-a*
- *Ispitati anti-angiogeni potencijal paklitaksela u MDR modelima posredstvom ekspresije i sekrecije VEGF-a*
- *Ispitati promene u distribuciji ćelijskog ciklusa koje izaziva paklitaksel nakon jednokratnog i kontinuiranog tretmana*
- *Izvršiti kariotipizaciju senzitivnih i rezistentnih ćelijskih linija*
- *Ispitati promene u tumor supresor genima (p53 i PTEN) nastale nakon indukovanja rezistencije*

Drugi važan cilj ove doktorske disertacije je bila validacija dobijenih MDR modela i zato su postavljeni dodatni zadaci:

- *Ispitati efikasnost anti-kancer agenasa sa različitim mehanizmom dejstva (inhibitor Akt-a, inhibitor Ras-a i inhibitori P-glikoproteina) kod senzitivnih i rezistentnih ćelija*
- *Ispitati dejstvo kombinacija pomenutih supstanci sa paklitakselom radi utvrđivanja njihovog potencijala za senzitivizaciju MDR ćelija na tretman paklitakselom*
- *Proveriti postojanje sinonimnih polimorfizama u *mdr1* genu, koji mogu uticati na afinitet P-glikoproteina prema supstratima i inhibitorima*

3. MATERIJAL I METODE

3.1. DROGE

U eksperimentima su korišćene sledeće droge: paklitaksel (PTX), R \pm Verapamil (Dex-VER) i vinblastin (VBL) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), doksorubicin (DOX) (EBEWE Arzneimittel GmbH, Vienna, Austrija), epirubicin, (EPI) (Pharmacia & Upjohn S. P. A., Italija), etoposid (VP-16) (Nippon Kayaku Ltd., Japan), cisplatin (CPT) (Pfizer (Perth) Pty Ltd, Australija), tarikvidar (TQ) dobijen na poklon od Dr. Sven Rottenberg iz Holandskog Instituta za kancer u Amsterdamu, GSK690693 i Tipifarnib dobijeni na poklon od SelleckChem, USA i jatrofani eufodendrofan H (Euph H) i eufodendrofan S (Euph S) izolovani iz *Euphorbia dendroides* (Jadranin i saradnici, 2013).

DOX, EPI, VP-16 i VBL su rastvoreni u dejonizovanoj vodi i njihovi 1 mM rastvori su čuvani na -20°C. PTX je rastvoren u 100% etanolu i 1 mM alikvoti su čuvani na -20°C. Dex-VER i CPT su čuvani na sobnoj temperaturi u koncentraciji od 1 mM. TQ je rastvoren u dimetilsulfoksidu (DMSO) i 10 μ M alikvoti su čuvani na -20°C. GSK690693 i Tipifarnib su rastvoreni u apsolutnom etanolu i 10 mM alikvoti su čuvani na -20°C. 20 mM alikvoti Euph H i Euph S su čuvani u 100% etanolu na -20 °C. Radni rastvori od 1mM su pripremani u 25% etanolu. Pre tretmana, sve droge su rastvarane u sterilnoj vodi.

3.2. HEMIHALIJE I REAGENCI

U eksperimentima su korišćene sledeće hemikalije i reagensi: RPMI 1640 medijum, minimalni esencijalni medijum (MEM), L-glutamin, fetalni goveđi serum (FBS) i tripsin/EDTA (PAA, Austrija), smeša antibiotik-antimitotik, smeša penicilin-streptomycin, sulforodamin B (SRB), rodamin 123 (Rho123), dimetilsulfoksid (DMSO), 4-6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) i tripan plavo (TB) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), propidijum jodid (PI) (Roche Applied Science, Švajcarska), RNKza A i TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, SAD), metanol/sirćetna kiselina i

gimza (BDH Chemicals, Velika Britanija), etidijum bromid (Merck, Nemačka), i agaroza (Applichem GmbH, Nemačka).

3.3. KULTIVISANJE ĆELIJA

3.3.1. DLD1 i DLD1-TxR

Parentalna DLD1 humana ćelijska linija je nabavljena od American Type Culture Collection (ATCC, SAD), gde se vodi pod oznakom CCL-221. DLD1 je ćelijska linija humanog karcinoma debelog creva. Parentalne ćelijske linije se smatraju senzitivnim obzirom da su dobijene od pacijenata koji nisu podvrgnuti terapiji, a kod kojih je dijagnostikovao primarni tumor. Odgovarajuća rezistentna ćelijska linija DLD1-TxR dobijena je selekcijom iz DLD1 ćelijske linije izlaganjem postepeno rastućim koncentracijama (60-600 nM) u periodu od 10 meseci. DLD1 i DLD1-TxR ćelije su kultivisane u RPMI-1640 medijumu uz dodatak 10% FBS-a, 2 mM L-glutamina i smeše antibiotika 10 000 U/ml penicilina, 10 mg/ml streptomicina, i antimikotika 25 µg/ml amfotericina B. Kulture ovih ćelija su održavane u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan) na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Pasaža ćelija je vršena po dostizanju 80-90% konfluentnosti u flaskovima površine 25 cm² i 75 cm² (Nalgene Nunc, Danska) pomoću 0,25% tripsin/EDTA rastvora. Broj ćelija je određivan na invertnom mikroskopu (Olympus, Nemačka). Ćelije su potom zasejavane u odgovarajućoj gustini u svež medijum za dalje eksperimente ili za dalje umnožavanje i održavanje u kulturi (8,000 ćelija/cm² za DLD1 i 16,000 ćelija/cm² za DLD1-TxR liniju).

3.3.2. U87 i U87-TxR

Parentalna U87 humana ćelijska linija je nabavljena od American Type Culture Collection (ATCC, SAD) gde se vodi pod oznakom HTB-14. Odgovarajuća rezistentna ćelijska linija U87-TxR je dobijena nakon izlaganja U87 ćelija postepeno rastućim koncentracijama PTX-a (100-300 nM) u toku 9 meseci. U87 i U87-TxR ćelije su kultivisane u MEM medijumu uz dodatak 10% FBS, 2 mM L-glutamina i smeše antibiotika 5000 U/ml penicilina i 5 mg/ml streptomicina. Pasaža ćelija je vršena dva

puta nedeljno po dostizanju 80-90% konfluentnosti u flaskovima površine 25 cm² i 75 cm². Nakon postupka tripsinizacije ćelije su brojane na invertnom mikroskopu. Ćelije su potom zasejavane u odgovarajućoj gustini u svež medijum za dalje eksperimente ili za dalje umnožavanje i održavanje u kulturi (16,000 ćelija/cm² za U87 i 32,000 ćelija/cm² za U87-TxR liniju).

3.3.3. Jednokratni tretman i istovremene kombinacije

Za ispitivanje jednokratnog efekta droga (PTX, VBL, EPI, DOX, VP-16 i CPT) na inhibiciju ćelijskog rasta, ćelije su zasejavane 24 h pre tretmana. Nakon adaptacije ćelija, tretman drogama je trajao 72 h. Opseg koncentracija korišćenih u tretmanima je varirao za različite droge (Tabela 1). Takođe, efekti GSK690693 (5 –100 µM), Tipifarniba (1 – 50 µM), kao i Euph H i Euph S (2,5 – 50 µM) na inhibiciju ćelijskog rasta određeni su u jednokratnom (72 h) tretmanu. Za potrebe testova vijabilnosti ćelije su zasejavane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Nunc, Nalgene, Danska). Gustina DLD1 i DLD1-TxR ćelija je bila 4000 po bunariću u 200 µl medijuma, a gustina U87 i U87-TxR ćelija 8000 po bunariću u 200 µl medijuma. Kao kontrola su korišćene istovremeno zasejane netretirane ćelije. U ovako osmišljenom eksperimentalnom modelu, pored pojedinačnih efekata droga, ispitan je i istovremeni kombinovani efekat PTX-a sa sledećim drogama: GSK690693, Tipifarnibom, Euph H, Euph S, Dex-VER i TQ u trajanju od 72 h na rezistentnim linijama (DLD1-TxR i U87-TxR). U istovremenom tretmanu različite koncentracije GSK690693 (1, 2,5 i 5 µM) i Tipifarniba (0,5, 1, i 2,5 µM), kao i 5 µM Euph H, Euph S, Dex-VER i 50 nM TQ su kombinovane sa PTX-om (0,005 – 5 µM).

Tabela 1. Opseg koncentracija različitih droga korišćenih u tretmanima senzitivnih i rezistentnih ćelijskih linija

Drugs	DLD1	DLD1-TxR	U87	U87-TxR
PTX	0,005 – 15 μ M	0,005 – 15 μ M	0,01 – 25 μ M	0,01 – 25 μ M
VBL	5 – 50 nM	25 – 500 nM	1,5 – 15 nM	25 – 500 nM
EPI	25 – 500 nM	1 – 15 μ M	25 – 500 nM	0,1 – 2 μ M
DOX	25 – 500 nM	1 – 15 μ M	25 – 500 nM	0,1 – 2 μ M
VP-16	0,5 – 10 μ M	15 – 90 μ M	0,5 – 10 μ M	1 – 15 μ M
CPt	2,5 – 15 μ M	5 – 30 μ M	0,5 – 10 μ M	0,5 – 10 μ M

3.4. ODREĐIVANJE BROJA ĆELIJA

Bojenjem ćelija tripan plavim (TB, engl. „trypan blue“) dobija se uvid u njihovu brojnost i kvalitet. Princip bojenja se zasniva na činjenici da TB ne prodire u unutrašnjost živih ćelija koje imaju intaktnu ćelijsku membranu, te one ostaju neobojene (pod mikroskopom svetle beličaste ćelije). Na taj način, vijabilne ćelije se mogu razlikovati od mrtvih ćelija. Brojanje ćelija je vršeno mikroskopski na hemocitometru. Za postavljanje eksperimenata brojanja odnos razblaženja 0,4% TB rastavora u 1x PBS, 1x PBS i ćelija u medijumu je bio 5:3:2. U periodu od 5 min je omogućeno prodiranje TB u mrtve ćelije. Zatim je po 10 μ l obojene ćelijske suspenzije ubrizgano u obe izbrazdane komorice hemocitometra. Ćelije su brojane u obe komorice hemocitometra, u po 5 pet polja. Ukupan broj živih ćelija je određivan po sledećem obrascu:

$$\text{ukupan broj ćelija/ml} = \text{prosečan broj ćelija po kvadrantu komorice} \times \text{razblaženje ćelija} \times 10^4,$$

gde je 10^4 faktor komorice.

3.5. SRB TEST VIJABILNOSTI

Sulforodamin B (SRB) je negativno naelektrisna supstanca sa dve sulfonske grupe kojima se elektrostatički vezuje za bazne ostatke aminokiselina, bojeći ukupne

proteine ćelija ružičastom bojom. Test je izveden prema opisanoj proceduri (Skehan i saradnici 1990). Ukratko, na kraju perioda predviđenog za tretman ćelija u mikrotitar ploče sa 96 bunarića, dodavano je po 50 μ l 50% trihlor-sirćetne kiseline u svaki bunarić radi fiksacije ćelija. Fiksacija je trajala 1 h na 4°C. Ćelije su potom ispirane pet puta tekućom vodom. Nakon toga, po 50 μ l 0,4% rastvora SRB boje u 1% sirćetnoj kiselini je dodavano u svaki bunarić i ostavljano 30 min na sobnoj temperaturi. Višak boje je potom uklanjn ispiranjem 3 puta sa 300 μ l 1% sirćetne kiseline po bunariću. Ploča je zatim sušena na 45°C u termostatu. SRB koji je vezan za proteine je na kraju rastvoren u 10 mM TRIS-u (200 μ l po bunariću). Na kraju testa apsorbanca je određivana na ELISA čitaču (LKB 5060-006 Micro Plate Reader, Austrija), na talasnoj dužini 540 nm sa korekcijom na 670 nm.

3.6. ANALIZA EFEKATA DOBIJENIH KOMBINOVANJEM DROGA

Analiza efekata droga u kombinaciji je izvršena na osnovu podataka o procentu inhibicije ćelijskog rasta u SRB testu. Priroda međudejstva (sinergizam, antagonizam ili aditivni efekat) dve droge je određena primenom CalcuSyn kompjuterskog softvera. Ovaj program koristi metod kombinacionog indeksa (Chou & Talalay, 1984), koji se zasniva na jednačini srednjeg efekta više droga. Ovaj metod uzima u obzir efekat svake supstance pojedinačno, efekat dve supstance u kombinaciji, kao i njihovog doza - efekat linearnog grafikona. Ova analiza zahteva da se raspolaže vrednostima inhibicije za po najmanje tri doze svake supstance pojedinačno. CalcuSyn program pruža mogućnost prikaza rezultata međudejstva dve supstance klasičnim izobologramom ili tabelarno sa vrednostima kombinacionog indeksa (CI). Raspodela vrednosti kombinacionog indeksa, koje opisuju prirodu međudejstva: sinergizam ($CI < 0,9$), antagonizam ($CI > 1,1$) i aditivni efekat ($CI = 0,9-1,1$), preuzeta je iz prethodno objavljenog rada (Peters i saradnici, 2000). CI vrednosti prikazane u ovom radu su reprezentativni rezultati najmanje dve izvedene analize.

3.7. IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISELINA

3.7.1. Izolacija genomske DNK

Genomska DNK iz ćelija je izolovana TRIZOL reagensom prema proceduri proizvođača:

Liziranje i homogenizacija – DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm². Nakon 72 h, ćelije su tripsinizirane i centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Po odlivanju supernatanta, ćelije su resuspendovane u PBS-u nakon čega su ponovo centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Supernatant je odlivan, pa su ćelije lizirane 5 min sa 1 ml TRIZOL-a.

Razdvajanje faza – U svaki uzorak je zatim dodavano 200 µl hloroforma. Pošto se snažno protresu, uzorci se inkubiraju na sobnoj temperaturi još 2-3 min. Zatim sledi centrifugiranje 15 min na 12 000 x g pri 4°C. Na taj način smeša je razdvajana na tri faze, donju crvenu fenol-hloroformsku, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu.

Precipitacija DNK – Vodena faza je pažljivo uklonjena i DNK je precipitirana sa 300 µl hladnog 100% etanola. Nakon toga, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 2-3 min i centrifugirani 5 min na 2 000 x g pri 4°C.

Ispiranje DNK – Supernatant je uklonjen i talog DNK je ispiran dva puta u rastvoru 0,1 M natrijum citrata u 100% etanolu. Tokom svakog ispiranja DNK pelet je inkubiran 30 min u rastvoru za ispiranje na sobnoj temperaturi i centrifugiran 5 min na 2 000 x g pri 4°C. Nakon toga, DNK je ispirana sa 2 ml 75% etanola, inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana 5 min na 2 000 x g pri 4°C.

Rastvaranje DNK – Nakon centrifugiranja, etanol je odlivan i talog je sušen na sobnoj temperaturi. DNK je rastvarana u 8 mM NaOH. Nakon potpunog rastvaranja DNK, koncentracija DNK je merena spektrofotometrijski (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka).

3.7.2. Provera kvaliteta DNK

Očuvanost i kvalitet izolovane DNK je proverena elektroforezom uzoraka na 0,8% agaroznom gelu. Agarozni gel se pravi rastvaranjem 0,8 g agaroze u 100 ml 1x TBE pufera, pH 8,2 (0,09 M Tris-borat, 0,02 M EDTA), zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici do rastvaranja. U agarozni rastvor, ohlađen do 50°C, dodaje se finalno 0,4

µg/ml etidijum bromida, a zatim se gel izliva u kalup za elektroforezu i ostavi da polimeriše.

Uzorak DNK se priprema tako što se 5 µl rastvora DNK pomeša sa 1 µl boje (0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu) i zatim se nanosi na polimerizovan agarozni gel. Elektroforeza se vrši u 1x TBE puferu na 100 V. Nakon elektroforeze DNK se vizuelizuje na Gel Doc sistemu (Gel Doc 1000, Bio Rad, SAD). Intaktna DNK daje jasne oštre trake, dok degradirani molekuli formiraju razmaz duž gela.

3.7.3. Izolacija RNK

Ukupna RNK iz ćelija je izolovana TRIZOL reagensom prema proceduri proizvođača:

- 1) Liziranje i homogenizacija** – DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm². Nakon 72 h, ćelije su tripsinizirane i centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Po odlivanju supernatanta, ćelije su resuspendovane u PBS-u nakon čega su ponovo centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Supernatant je odlivan, pa su ćelije lizirane 5 min sa 1 ml TRIZOL-a. Ovako lizirani i homogenizovani uzorci čuvani su na -70°C najviše mesec dana.
- 2) Razdvajanje faza** – Homogenizovani uzorci su otapani na sobnoj temperaturi, ukoliko su zamrznuti, da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali. U svaki uzorak je zatim dodavano 200 µl hloroforma. Pošto se snažno protresu, uzorci se inkubiraju na sobnoj temperaturi još 2-3 min. Zatim sledi centrifugiranje 15 min na 12 000 x g pri 4°C na centrifugi sa hlađenjem (Centrifuge 5427R Eppendorf, Nemačka). Na taj način smeša je razdvajana na tri faze, donju crvenu fenol-hloroformsku, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalazi RNK. Vodenu fazu čini 60% zapremine TRIZOL-a korišćenog za liziranje.
- 3) Precipitacija RNK** – Vodena faza se pažljivo prenosi u nove tubice i dodaje 500 µl izopropanola. Uzorci se zatim inkubiraju 10 min na sobnoj temperaturi, pa centrifugiraju 10 min na 12 000 x g pri 4°C. Na taj način RNK precipitira formirajući beličasti talog na dnu tubica.
- 4) Ispiranje RNK** – Supernatant se uklanja i talog RNK se ispira sa 1 ml 75% rastvora etanola u 0,1% DEPC vodi. Uzorci se centrifugiraju 5 min na 7 500 x g pri 4°C.

- 5) **Rastvaranje RNK** – Nakon centrifugiranja uzoraka, etanol je odlivan i talog je sušen na sobnoj temperaturi. RNK je rastvarana u 0,1% DEPC vodi. DEPC je potentni inhibitor RNKaze. Koncentracija RNK je merena spektrofotometrijski (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka).

3.7.4. Provera kvaliteta RNK

Kvalitet RNK je ispitivan elektroforezom uzoraka na 1,3% agaroznom gelu (1,3 g agaroze u 100 ml 1 x TBE pufera) sa 0,4 µg/ml etidijum bromida. Uzorak RNK je pre nanošenja na gel mešan sa 0,4% rastvorom bromfenol plavo u 50% glicerolu u zapreminskom odnosu 1:1.

Nakon elektroforeze u 1 x TBE puferu pri 100 V, RNK je vizualizovana na „Gel-Doc“ sistemu (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Kvalitet izolovane RNK je utvrđivan upoređivanjem odnosa inteziteta 28S i 18S traka.

3.8. ANALIZA EKSPRESIJE GENA RT-PCR METODOM

3.8.1. Reakcija reverzne transkripcije

Reverzna transkripcija (RT) je reakcija u kojoj se na osnovu molekula RNK kao matrice sintetišu njoj komplementarni lanac DNK (kDNK). Za reakciju sinteze kDNK potrebni su: reverzna transkriptaza (RNK zavisna DNK polimeraza), deoksiribonukleotidi, inhibitor enzima RNKaze (RNazin) i prajmer za početak sinteze molekula kDNK. Kao prajmeri mogu poslužiti nasumični heksameri, 3' prajmeri ili oligodT-niz od 12-18 dTTP nukleotida.

Totalna RNK (2,5 µg) dopunjena sa 0,1% DEPC vodom do 25,5 µl je pripremana za RT reakciju zagrevanjem na 65°C, 10 min. RT miks (0,65 µM oligo-dT₁₆, 1 x pufer, 50 µM dATP, 50 µM dTTP, 50 µM dGTP, 50 µM dCTP, 10 mM DTT, 0,4 UI/µl RNazin i 4 UI/µl M-MLV reverzna transkriptaza) je zatim dodavan ohlađenim uzorcima RNK do finalne zapremine 50 µl. RT reakcija je trajala 1 sat na 42°C, a zaustavljena je zagrevanjem uzoraka 5 min na 95°C. Uzorci su ohlađeni i dobijena kDNK (100 ng/µl) je čuvana na -20°C.

3.8.2. PCR reakcija

Osnovni princip PCR (engl. „polymerase chain reaction“) reakcije se zasniva na seriji lančanih reakcija, koje katalizuje DNK zavisna DNK polimeraza („Taq“ polimeraza). Na taj način se umnožava ciljna sekvencna na DNK matrici (kod RT-PCR-a to je kDNK). Za ovu reakciju su potrebni DNK, prajmeri (kratki oligonukleotidi komplementarni matrici), dezoksiribonukleotidi, pufer i enzim koji katalizuje ugradnju nukleotida u novi lanac DNK.

Proces amplifikacije se izvodi u seriji cikličnih izmena temperatura čime se obezbeđuje denaturacija molekula DNK, hibridizacija amplimera sa matricom i elongacija umnožaka. Za uspešno umnožavanje svake ciljne sekvence moraju se optimizovati uslovi, kao što su temperatura hibridizacije prajmera (engl. „annealing“), koncentracija Mg^{2+} jona, koncentracija prajmera, koncentracija kDNK i ukupni broj ciklusa amplifikacije.

Semikvantitativnom RT-PCR analizom se istovremeno amplifikacijom određuje nivo ekspresije gena od interesa u odnosu na nivo ekspresije nekog kontrolnog gena. Kontrolni gen (endogena i interna kontrola) predstavlja konstitutivno eksprimirani gen sa stabilnom ekspresijom nezavisno od tkiva, sredinskih faktora i stanja u kojem se ćelija nalazi.

PCR reakcija je korišćena za detekciju ekspresije iRNK sa odgovarajućim prajmerima za gene: *mdr1* (Bosch i saradnici, 1997), *mrp1* (Chadderton i saradnici, 1997), *gst-π* (O'Driscoll i saradnici, 1993) i *vegf* (Westphal i saradnici, 2000i). Kao interne kontrole korišćene su ekspresije iRNK sa odgovarajućim prajmerima za gene: *gapdh* (gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza) (Wong i saradnici, 1994) za normalizaciju ekspresije *mdr1* i β-aktin (Ponte i saradnici, 1984) za normalizaciju ekspresije ostalih gena. Različite endogene kontrole su korišćene kako bi se izbeglo preklapanje signala kontrolnih i ciljnih gena usled približno istih dužina umnoženih fragmenata. PCR reakcije su izvođene na GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD) pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 94°C 5 min, 27 ciklusa na 94°C 15s, 56°C 30s, 72°C 30s i na 4°C neograničeno dugo. Za amplifikaciju *mdr1* gena, broj ciklusa je smanjen na 23 kod DLD1 i DLD1-TxR ćelije, a kod U87 i U87-TxR ćelija na 26 ciklusa. Za amplifikaciju *mrp1* gena, temperatura hibridizacije amplimera je povećana na 58°C, a broj ciklusa je smanjen na 25. Amplifikacija *vegf* se odvijala 35 ciklusa na 62°C. Da bi se postigla linearna amplifikacija odnos amplimera *gapdh:mdr1*

je bio 1:4, β -aktin:mrp1 1:4, β -aktin:gst- π 1:9, β -aktin:vegf 1:5 kod DLD1 i DLD1-TxR ćelija. Kod U87 i U87-TxR ćelija odnos amplimera *gapdh:mdr1* je bio 1:5, β -aktin:mrp1 1:5, β -aktin:gst- π 1:10, β -aktin:vegf 1:5. 100 ng kDNK je upotrebjeno za amplifikaciju svih iRNK, osim *vegf*, gde se u PCR reakciju ulazilo sa 150 ng kDNK. U svim reakcijama koncentracija $MgCl_2$ je finalno iznosila 2 mM, a finalna koncentracija svakog dNTP 0,2 mM. Provera PCR reakcija je vršena višestrukim ponavljanjem amplifikacije uzoraka poreklom iz dve nezavisne RT reakcije.

3.8.3. Analiza PCR produkta

PCR produkti su analizirani na 2% agaroznom gelu u sistemu za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad, SAD). Na gelu je analiziran ceo reakcioni volumen od 25 μ l sa dodatkom 5 μ l 0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu. Nakon elektroforeze u 1 x TBE puferu produkti su vizualizovani na „Gel-Doc“ sistemu (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Denzitometrijska analiza i kvantifikacija dobijenog signala je vršena na „Multi-Analyst/PC Software Image Analysis System“ (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Dobijene vrednosti signala za određeni gen u svakom uzorku su izražene relativno u odnosu na vrednost signala interne kontrole. Tako dobijene relativne ekspresije su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.9. ANALIZA EKSPRESIJE P-GLIKOPROTEINA

Nivo ekspresije P-gp-a na parentalnim i rezistentnim ćelijama analizirana je metodom protočne citofluorimetrije. Ćelije su tripsinizirane, ispirane u hladnom PBS-u i direktno bojene FITC-konjugovanim P-gp antitelom (BD Biosciences, Velika Britanija) u zapreminskom odnosu prema PBS-u 1:10, 30 min na ledu u mraku. Izotipska kontrola IgG2b κ (Abcam, Velika Britanija) je korišćena kako bi se diskriminisala nespecifična fluorescenca. Pre analize, ćelije su fiksirane u 4% paraformaldehidu. Uzorci su čuvani na ledu u mraku do očitavanja na protočnom citofluorimetru FACSCalibur (Becton Dickinson, Velika Britanija). Fluorescenca FITC-konjugovanog anti-P-gp-a je određena na FLH-1 kanalu na talnoj dužini 530 nm. Za analizu u svakom uzorku je prikupljeno 10 000 pojedinačnih događaja (vijabilnih

ćelija), a dobijeni rezultati su analizirani softverskim paketom CellQuest Pro Software (Becton Dickinson, Velika Britanija).

3.10. ODREĐIVANJE PRISUSTVA POJEDINAČNIH NUKLEOTIDNIH POLIMORFIZAMA *MDR1* GENA

Prisustvo SNP na poziciji 3435 *mdr1* gena je analizirana koristeći Taqman FAM/VIC - MGB sistem za diskriminaciju alela (Livak, 1999). Probe i oligonukleotidi su obeleženi na 5' kraju fluorescentnim bojama Fam i Vic (Hüebner i saradnici, 2007; Brant i saradnici, 2003). Reakciona smeša je pripremana koristeći 2x Taqman Universal Master Mix, 40x SNP Genotyping Assay Mix i 150 ng genomske DNK u finalnom volumenu od 25 μ l po reakciji. PCR reakcije su izvođene na ABI Prism 7000 sistemu za detekciju sekvenci (Applied Biosystems, SAD) pod sledećim uslovima: 10 min na 95°C za aktivaciju enzima, koja je praćena sa 40 ciklusa na 95°C 15s i 60°C 1min za hibridizaciju i elongaciju. Rezultati diskriminacije alela su određeni korišćenjem engl. "end-point read" metode.

3.11. AKUMULACIJA RODAMINA 123 I DOKSORUBICINA

Akumulacija Rho 123 i DOX-a je analizirana metodom protočne citofluorimetrije korišćenjem sposobnosti ovih P-gp supstrata da emituju fluorescencu. Citofluorimetrijski određen intenzitet fluorescence Rho 123 i DOX-a, u vijabilnim ćelijama, je srazmeran njihovoj akumulaciji (Zheng i saradnici, 2009).

Za upoređivanje nivoa P-gp aktivnosti između parentalnih i rezistentnih linija kao pozitivna kontrola za akumulaciju Rho 123 i DOX-akorišćen je Dex-VER, poznati inhibitor P-gp aktivnosti. DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm² i nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, ćelije su tripsinizirane i resuspendovane u tubama u 1 ml medijuma. Zatim su ćelije tretirane sa 5 μ M Rho123 ili 20 μ M DOX-a, pojedinačno ili u kombinaciji sa 5 μ M VER. Puls Rho 123 i DOX-a je trajao 30 min odnosno 120 min u inkubatoru na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Na kraju perioda predviđenog za akumulaciju Rho 123 i

DOX-a, ćelije su nataložene centrifugiranjem 5 min na 1800 rpm (Centrifuge 5804 Eppendorf, Nemačka). Zatim su isprane hladnim 1xPBS-om i ponovo centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Ćelije spremne za analizu na citofluorimetru su resuspendovane u 1xPBS sa 10% FBS i čuvane na 4 °C u mraku.

Promene u akumulaciji Rho 123 praćene su nakon tretmana sa modulatorima P-gp-a Euph H i Euph S na MDR linijama. Kao pozitivna kontrola korišćeni su Dex-VER i TQ, poznati inhibitori P-gp-a. DLD1-TxR i U87-TxR ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm² i nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, ćelije su tripsinizirane i resuspendovane u tubama u 1 ml medijuma koji sadrži Rho 123. Zatim su ćelije tretirane sa Euph H, Euph S, Dex-VER (5 µM) i TQ (50 nM) i inkubirane na temperaturi 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ u trajanju od 30 min. Na kraju perioda predviđenog za akumulaciju Rho 123, ćelije su nataložene centrifugiranjem 5 min na 1800 rpm. Zatim su isprane hladnim 1xPBS-om i ponovo centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Ćelije spremne za analizu na citofluorimetru su resuspendovane u 1xPBS sa 10% FBS i čuvane na 4 °C u mraku.

Akumulacija Rho 123 i DOX-a je analizirana na protočnom citofluorimetru FACSCalibur (Becton Dickinson, Velika Britanija). Narandžasta fluorescenca Rho 123 i DOX-a je merena na kanalu za fluorescencu 2 (FLH-2) pri talasnoj dužini 530 nm. Za analizu u svakom uzorku je prikupljeno 10 000 pojedinačnih događaja (vijabilnih ćelija). Kao kontrola korišćene su nebojene ćelije (ćelije koje nisu inkubirane u medijumu sa Rho 123 ili DOX). Razlike u obliku krive su kvantifikovane Komogorov-Smirnov neparametarskom statistikom. Statistička značajnost je utvrđena softverskim paketom CellQuest Pro na Macintosh kompjuteru.

3.12. KOLORIMETRIJSKA DETEKCIJA GLUTATIONA (GSH)

Koncentracija redukovanog GSH u ćelijama je određivana korišćenjem APOGSHTM Glutathione Colorimetric Detection paketa (GSH Colorimetric Detection Kit, Bio-Vision, USA). Esej se zasniva na reakciji DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina) sa GSH pri čemu se stvaraju 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina i oksidovani glutation (GSSG). 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina je produkt žute boje srazmeran koncentraciji GSH u ćeliji. 5-sulfosalicilna kiselina (SSA) uklanja proteine

iz uzorka i štiti GSH od oksidovanja i delovanja γ -glutamil transpeptidaze. Određivanje koncentracije GSH je izvedeno prema proceduri modifikovanoj u odnosu na preporučenu od proizvođača. Ćelije su kultivisane u flaskovima površine 75 cm². Nakon tripsinizacije, po $7,0 \times 10^6$ DLD1/DLD1-TxR i $2,5 \times 10^6$ U87/U87-TxR ćelija su centrifugirane 5 min na 700 x g pri 4°C. Nakon odlivanja supernatanta ćelijski talog je resuspendovan u 0,5 ml hladnog PBS-a i uzorci su ponovo centrifugirani 5 min na 700 x g pri 4°C. Talog ćelija je liziran dodavanjem 80 μ l hladnog glutationskog pufera 10 min na ledu. Jedan deo lizata je korišćen za spektrofotometrijsko merenje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka). Zatim je u svaki uzorak dodato po 20 μ l 5% SSA. Uzorci su dobro promešani i centrifugirani 10 min na 8 000 x g pri 4°C. Izdvojen supernatant je prenošen u nove tubice. Razblaženja uzoraka su po potrebi pravljena sa 1% SSA. Koncentracije standarda, u rasponu od 0-100 ng, dobijene su od koncentrovanog standarda (1 μ g/ μ l) rastvorenog u 1% SSA. Glutationski pufer (160 μ l) je sipan u svaki bunarić mikrotitar ploče sa 96 bunarića i inkubiran 10 min na sobnoj temperaturi. Zatim je glutationskom puferu dodavano po 20 μ l standarda ili uzorka. Finalno, žuta boja je razvijana pažljivim mešanjem uzoraka sa 20 μ l rastvora supstrata. Apsorbanca je očitavana na talasnoj dužini 405 nm na ELISA čitaču (LKB 5060–006 Micro Plate Reader, Austrija). Koncentracija GSH je određivana na osnovu kalibracione standardne krive formirane u softverskom programu GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., SAD) i kvantifikovana u odnosu na koncentraciju proteina u ćelijskom lizatu.

3.13. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VEGF-a U SUPERNATANTU ĆELIJSKE KULTURE

Humani VEGF imunoesej (QuantikineTM, R&D Systems, SAD) predstavlja kvantitativnu imuno-tehniku za određivanje koncentracije VEGF-a u supernatantu ćelijske kulture. Mikrotitar ploče sa 96 bunarića su obložene monoklonskim antitelom, specifičnim za VEGF. Prema uputstvu proizvođača, rekombinovani humani VEGF je rekonstituisan u 1 ml kalibracionog rastvora RD5K. Na taj način je dobijen VEGF standard koncentracije 2 000 pg/ml. Nakon 15 min, od početnog rastvora je pravljena serija razblaženja: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 i 15,6 pg/ml. Sam kalibracioni rastvor RD5K je korišćen kao nulti standard 0 pg/ml. DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-

TxR ćelijske linije su zasejavane u ploče sa 6 bunarića, i nakon 24 h su tretirane sa IC₅₀ vrednostima PTX-a za svaku ćelijsku liniju. Nakon 72 h, medijum iz ćelijske kulture je centrifugiran 10 min na 2 500 rpm. Na taj način je dobijen supernatant u kojem je merena koncentracija sekretovanog VEGF-a. Supernatant koji nije korišćen neposredno, čuvan je na -80°C. Za određivanje koncentracije VEGF-a u bunariće mikrotitar ploča je neposredno pre dodavanja 200 µl standarda ili uzorka, sipano po 50 µl RD1W rastvora. Mikrotitar ploče sa uzorcima i standardima su pokrivane adhezivnom trakom i inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi. Zatim je 3 puta vršeno ispiranje komercijalnim puferom uz potpuno uklanjanje tečnosti iz bunarića. Nakon dodavanja po 200 µl konjugata HRP/Anti-VEGF po bunariću, ploče su pokrivane novom adhezivnom trakom i inkubirane naredna 2 h na sobnoj temperaturi. Bunarići su ponovo ispirani puferom 3 puta i u njih je dodavano po 200 µl rastvora supstrata (H₂O₂ : TMB, u zapreminskom odnosu 1:1), 20 min na sobnoj temperaturi. Za razvijanje boje dodavano je 50 µl 25 mM H₂SO₄ po bunariću. Apsorbanca je određivana na ELISA čitaču na talasnoj dužini 450 nm. Standardna kriva sa koje su određene koncentracije VEGF-a formirana je u softverskom programu GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., SAD).

3.14. ANALIZA ĆELIJSKOG CIKLUSA

Ćelije u toku ćelijskog ciklusa prolaze kroz nekoliko faza koje se razlikuju po sadržaju DNK. Kod nesinhronizovane kulture ćelija, u trenutku merenja, deo ćelijske populacije nalazi se u G₀/G₁ fazi, gde je sadržaj DNK 2N, deo u S fazi, gde je sadržaj DNK 2N-4N, a deo u G₂/M fazi, gde je sadržaj DNK 4N. Poliploidne ćelije imaju sadržaj DNK > 4N. Apoptotične ćelije su hipodiploidne, tj. imaju sadržaj DNK < 2N, zbog čega se označavaju kao subG₀ populacija ćelija.

Za analizu ćelijskog ciklusa korišćen je aparat FACSCalibur (Becton Dickinson, Velika Britanija). DNK je obeležena propidijum jodidom (PI), koji fluorescira intenzivno narandžasto-crveno. Ćelijska membrana mora biti permeabilizovana pre bojenja DNK, kako bi propidijum jodid ušao u ćeliju. Zato se pre bojenja ćelije fiksiraju. Laser FACS aparata na 488 nm talasnoj dužini eksitira propidijum jodid vezan za DNK, koji potom emituje svetlost na 620 nm. Intenzitet emitovanog signala je

srazmeran sadržaju DNK u ćeliji i ukazuje na fazu ćelijskog ciklusa u kojoj se one nalaze.

Nesinhronizovane DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm² i inkubirane preko noći. Efekat IC₅₀ vrednosti PTX-a na distribuciju ćelijskog ciklusa je analiziran nakon 72 h. Takođe, efekat pojedinačnih i kombinovanih tretmana Euph H, Euph S i PTX-a na kinetiku ćelijskog ciklusa nakon 72 h je analiziran na MDR linijama. Uz adherentne ćelije, za analizu su uzete i ćelije koje plivaju u medijumu. Nakon odlepljivanja, ćelije su centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Talog ćelija je resuspendovan u 1xPBS i ćelije su centrifugirane ponovo, na 1800 rpm 5 min. Supernatant je pažljivo uklonjen, a ćelije su resuspendovane u 250 µl PBS-a i fiksirane dodavanjem 500 µl ledenog 70% etanola. Ovako fiksirane ćelije su držane 48 h na -20°C. Nakon fiksacije, ćelije su centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Etanol je pažljivo uklonjen. Talog ćelija je tretiran sa 133 µg/ml RNK-aze-A i inkubiran 15 min na temperaturi 37°C. Nakon toga, ćelije su tretirane sa 17 µg/ml PI. Nakon inkubacije 30 min na 37°C ćelije se prebacuju u tube namenjene za FACS aparat. Analiza uzoraka na FACS aparatu izvršena je pomoću Mod-FIT (Verity Software House, Inc) programa koji automatski određuje distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Za analizu u svakom uzorku je prikupljeno 10 000 pojedinačnih događaja (ćelija). Fluorescenca vezanog propidijum jodida merena je na FLH-2 detektoru aparata (585/42 nm) i prikupljena na linearno formiranoj skali.

3.15. CITOGENETSKA ANALIZA

Za određivanje strukture i broja hromozoma kod senzitivnih i rezistentnih ćelijskih linija korišćene su tehnike bojenja G traka i invertovanog DAPI bojenja. DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm² i po dostizanju 80-90% konfluentnosti izlagane su kolcemidu (0,1 µg/ml) 1 h na 37°C. Kolcemid inhibira polimerizaciju mikrotubula, sprečava formiranje deobnog vretena i na taj način zaustavlja ćelije u metafazi mitoze. Nakon odlivanja kolcemida, ćelije su dva puta ispirane u 1x PBS-u, tripsinizirane i centrifugirane 10 min na 1000 rpm. Ćelije su zatim tretirane hladnim, hipotoničnim rastvorom (0,075 mol/l KCl) i inkubirane 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ćelije su fiksirane rastvorom metanol/sirćetna kiselina (odnos 3:1) i centrifugirane 10 min na 1000 rpm. Ovaj postupak fiksacije ćelija

je ponovljen još tri puta. Nakon zadnjeg centrifugiranja, supernatant je odlivan do volumena 1,5 ml i resuspendovan. Po 5 kapi ovako rastvorenih, fiksiranih ćelija je nanošeno pasterovom pipetom na pločice, koje su sušene 12 h na vazduhu.

Za konstrukciju reprezentativnih kariotipova korišćene su tehnike bojenja G traka i invertovanog DAPI bojenja. Pločice su prvo potapane u tripsin, a zatim su ispirane sa 0,9% natrijum hloridom. Pločice su dalje bojene Gimza bojom ili DAPI bojom. Citogenetske analize su urađene koristeći „Ikaros“ softer ili „Isis“ softver (engl. „Metasystem“), pri čemu su oba opremljena „Zeiss“ mikroskopom (Zeiss, Nemačka).

3.16. ANALIZA MUTACIONOG STATUSA *p53* GENA

Mutacioni status *p53* gena u pet najčešće mutiranih egzona (5 – 9) analiziran je DNK sekvenciranjem. Najpre su primenom PCR metode umnožene sekvence ovih egzona iz DNK U87-TxR ćelija, kao i DNK iz U87 ćelija koja je poslužila kao kontrola sa “wild type” *p53* genom. Amplimeri i amplifikacioni profili korišćeni u eksperimentu su prethodno opisani u radu Andjelkovic i saradnici (2008) i prikazani su u Tabeli 2. Uspešnost reakcije proverena je vizuelizacijom dobijenih proizvoda na 2% agaroznom gelu po proceduri opisanoj u poglavlju 3.8.3. Nakon uspešne PCR reakcije umnoženi egzoni *p53* gena su analizirani na prisustvo mutacija procedurom DNK sekvenciranja.

Tabela 2. Sekvence amplimera i amplifikacioni profili za umnožavanje egzona *p53* gena

Amplimeri	Dužina (bp)	Sekvence amplimera	PCR profil
E5S ^a E5A ^b	269	5'-TGTTCACTTGTGCCCTGACT-3' 5'-CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 35 ciklusa
E6S E6A	181	5'-GCCTCTGATTCCTCACTGAT-3' 5'-TTAACCCTCCTCCAGAGA-3'	95°C(60s)60°C(60s)72°C(30s) 35 ciklusa
E7S E7A	171	5'-ACTGGCCTCATCTTGGGCCT-3' 5'-TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 35 ciklusa
E8S E8A	229	5'-TAAATGGGACAGGTAGGACC-3' 5'-TCCACCGCTTCTGTCTGC-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 35 ciklusa
E9S E9A	210	5'-ACTAAGCGAGGTAAGCAAGC-3' 5'-CTGGAACTTCCACTTGAT-3'	95°C (60s) 60°C (60s) 35 ciklusa

^aS, uzvodni amplimer (engl. „sense“); ^bA, nizvodni amplimer (engl. „antisense“)

Cilj ovog postupka je bio da se ispita prisustvo mutacija i da se one identifikuju. Mutirani egzoni su amplifikovani iz genomske DNK PCR metodom, primenom para prajmera i uslova reakcije specifičnim za date egzone (Tabela 2). Dobijeni fragmenti su prečišćeni korišćenjem DNK ekstrakcionog paketa (DNA extraction kit, Fermentas, Litvanija) prema proceduri proizvođača, zasnovanog na primeni silikatnog praha koji ima sposobnost vezivanja DNK pri visokim koncentracijama soli, odnosno njenog oslobađanja pri niskim koncentracijama. Kvalitet prečišćenih fragmenta je proveren na 2% agaroznom gelu po proceduri opisanoj u poglavlju 3.8.3., nanošenjem na gel 3 µl uzorka pomešanog sa 1 µl boje uporedo sa 2,5 µl DNK markera. U odnosu na intenzitet traka i sadržaj DNK markera denzitometrijski se određuju koncentracije prečišćenih uzoraka.

Prečišćeni fragmenti su sekvencirani u oba smera (5' i 3') i to modifikacijom metode po Sanger-u (engl. „dye-terminator sequencing“). Ova modifikacija se zasniva na primeni fluorescentno obeleženih didezoksinukleotida (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP; jedan tip ddNTP-jedna fluorescentna boja) koji se u jedinstvenoj reakciji sinteze DNK ugrađuju u rastući lanac i prekidaju sintezu. Dobijeni fragmenti, dužine različite za po jednu bazu, se razdvajaju automatskom elektroforezom, a tip ugrađenog ddNTP tj. sekvenca se očitava prema talasnoj dužini emitovanog fluorescentnog signala nakon pobuđivanja laserom u automatskom sekvenceru.

Sama procedura sekvenciranja je obuhvatala 1) dve nezavisne PCR reakcije sekvenciranja (engl. „cycle sequencing PCR“), svaka sa po jednim amplimerom (5' i 3') za sekvenciranje u oba smera, 2) zatim precipitaciju dobijenih amplikona, 3) njihovu dentaauraciju i 4) automatsku elektroforezu. Sekvencirajuće PCR reakcije su izvedene korišćenjem engl. „Applied Biosystems Incorporated (ABI) dye terminator sequencing“ paketa po proceduri proizvođača sa 10 ng prečišćenih DNK amplikona i 4 pmol finalne koncentracije amplimera pod sledećim amplifikacionim uslovima: inicijalna denaturacija na 96°C 1 min, 25 ciklusa na 96°C 10 s, 5 s na 50°C i 60°C 4 min, i na kraju 4°C neograničeno dugo. Dobijeni PCR proizvodi su istaloženi. Ukratko, PCR proizvodima su dodati EDTA (25 mM finalno) i EtOH (70-75% finalno). Smeša je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi a potom centrifugirana 30-45 min na 6 000 rpm i temperaturi od 4°C. Odliven je supernatant i dodavana nova količina 70% EtOH i smeša ponovo centrifugirana, ali ovog puta 25 min na 5 000 rpm na istoj temperaturi od 4°C. Supernatant je ponovo odlivan, a dobijeni talog je osušen na 90°C. Fragmentima u talogu je dodavano 15 µl Hi-dye formamida (Applied Biosystems, SAD) kako bi se

efikasno denaturisali na 95°C. 10 µl amplikona rastvorenih u formamidu je potom podvrgnuta automatskoj elektroforezi i očitavanju sekvence na aparatu ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SAD). Na kraju su dobijene sekvence analizirane i upoređene sa engl. "wild type" sekvencom p53 gena korišćenjem BLAST programa u NCBI GenBank bazi podataka.

3.17. ANALIZA GUBITKA HETEROZIGOTNOSTI *p53* i *PTEN* (LOH ANALIZA)

DNK dobijena iz U87/U87-TxR ćelija je korišćena za analiziranje gubitka heterozigotnosti (LOH analiza) *p53* tumor supresor gena, dok je DNK dobijena iz DLD1/DLD1-TxR ćelija je korišćena za LOH analizu *PTEN* tumor supresor gena. LOH analiza se zasniva na korišćenju visoko polimorfnih mikrosatelitskih markera vezanih za odgovarajući tumor supresor gen, njihovoj PCR amplifikaciji i kapilarnoj elektroforezi kako bi se utvrdio njihov gubitak delecijama, tj. gubitak tumor supresor gena za koji su vezani.

Četri polimorfna mikrosatelitska markera koji se nalaze u okviru hromozomskog regiona 17p13 korišćena su da bi se utvrdio gubitak heterozigotnosti *p53* tumor supresor gena. Izabrani markeri su bili TP53pentanucleotide, TP53dinucleotide, D17S1537 i D17S786, čiji su uzvodni amplimeri bili obeleženi na 5' kraju fluorescentnim bojama i to redom Fam, Pet, Ned i Vic (Galipeau i saradnici, 1999; Reid i saradnici, 2001). U svim reakcijama je amplifikovano 150 ng genomske DNK sa amplimerima u finalnoj koncentraciji 1 µM i Taq polimerazom u količini 1,5 U/reakciji prema sledećem amplifikacionom profilu: inicijalna denaturacija na 95°C 5 min, 35 ciklusa na 95°C 45 s, 30 s na lokus specifičnoj temperaturi hibridizacije i 72°C 1 min, finalna elongacija 72°C 1 h i na kraju 4°C neograničeno dugo i to sve u 25 µl reakcione smeše. Sekvence amplimera, dužina proizvoda kao i ostali lokus specifični uslovi PCR reakcija (temperatura hibridizacije i koncentracija Mg²⁺ jona) za svaki mikrosatelit su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Sekvence amplimera, očekivane dužine amplikona i specifičnosti PCR reakcija za mikrosatelitske markere p53 lokusa

Amplimeri	Dužina (bp)	Sekvence amplimera	T (°C)	MgCl ₂ (mM)
TP53pentanucleotide-F ^a TP53pentanucleotide-R ^b	74	5'-FAM-TAAAAAGGGAGAAGGAGGGG-3' 5'-GGAAGGGTCAACATCTTTTACA-3'	62	2
TP53 dinucleotide-F TP53dinucleotide-R	202	5'-PET-GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGT-3' 5'-ACCTGATTTCTTACTGCCTCTTGC-3'	60	3
D17S1537-F D17S1537-R	175-205	5'-NED-CTTTAGTCTGGGCACCAAGA-3' 5'-CCATCTTAGTCTCCCAAGCA-3'	62	2,5
D17S786-F D17S786-R	125-160	5'-VIC-TACAGGGATAGGTAGCCGAG-3' 5'-GGATTTGGGCTCTTTTGTA-3'	60	3

^a F, uzvodni amplimer (engl. "forward"); ^b R, nizvodni amplimer (engl. "reverse")

Drugi set od pet polimorfnih mikrosatelitskih lokusa koji okružuju ili se nalaze unutar PTEN gena (D10S579, D10S1765, D10S215, AFM086wg9 i D10S541) je izabrano za analizu sa ciljem da se detektuju moguće delecije u okviru celog PTEN lokusa koji se nalazi na hromozomu 10q23 (Feilotter i saradnici, 1998; Hahn i saradnici, 1999). Uzvodni amplimeri za svaki od mikrosatelitskih lokusa su obeležen na 5' kraju komercijalnim fluorescentnim bojama i to sledećim redom za pobrojane mikrosatelite Fam, Vic, Ned, Pet i Fam. Sekvence amplimera i opsezi očekivanih dužina proizvoda za svaki mikrosatelitski lokus su prikazani u Tabeli 4. Svaki mikrosatelitski marker je umnožen iz genomske DNK 25 µl reakcione smeše u prisustvu MgCl₂ u finalnoj koncentraciji 1,5 mM i svakog od dNTP-a u finalnoj koncentraciji 0,2 mM prema sledećem amplifikacionom profilu: inicijalna denaturacija na 95°C 5 min, 40 ciklusa na 95°C 30 s, 45 s na 55°C i 72°C 45 s, finalna elongacija 72°C 1 h i na kraju 4°C neograničeno dugo, sa izuzetkom lokusa D10S215 kod koga su vremena denaturacije, hibridizacije i elongacije u ciklusima produžena na po 1 min. Ostali lokus specifični uslovi PCR reakcija (finalne koncentracije amplimera, aditiva, količine Taq polimeraze i genomske DNK) za svaki mikrosatelit su prikazani u Tabeli 5.

Tabela 4. Sekvence amplimera i opseg dužina amplikona za mikrosatelitske markere PTEN lokusa

Amplimeri	Dužina (bp)	Sekvence amplimera
D10S579-F ^a D10S579-R ^b	260-276	5'-FAM-CCGATCAATGAGGAGTGCC-3' 5'-ATACACCCAGCCAATGCTGC-3'
D10S1765-F D10S1765-R	166-184	5'-VIC-ACACTTACATAGTGCTTTCTGCG-3' 5'-CAGCCTCCCAAAGTTGC-3'
D10S215-F D10S215-R	152-208	5'-NED-TGGCATCATTTCTGGGGA-3' 5'-GCTTTACGTTTCTTCACATGGT-3'
AFM086wg9-F AFM086wg9-R	154-162	5'-PET-AAATGTACGGTTCATTGACTT-3' 5'-GACTGACTACAAATGGGCA-3'
D10S541-F D10S541-R	108-130	5'-FAM-TTTTGAGTTTCTGTACCCATCCC-3' 5'-ATCCACAAGTAACAGAAAGCC-3'

^a F, uzvodni amplimer (engl. "forward"); ^b R, nizvodni amplimer (engl. "reverse")

Tabela 5. Lokus specifični uslovi PCR reakcija za mikrosatelitske markere PTEN lokusa

Komponente PCR reakcije	D10S579	D10S1765	D10S215	AFM086wg9	D10S541
Amplimeri (μM)	1	1,2	1,2	1,2	1
BSA ^a (mg/ml)	/	0,1	0,1	0,1	/
Taq polimeraza (U/reakciji)	1,5	1	2	2	1
Genomska DNK (ng/reakciji)	150	150	200	200	150

^a BSA, engl. "bovine serum albumin"

Uspešnost amplifikacija mikrosatelita za oba tumor supresor gena je proverena vizuelizacijom dobijenih proizvoda na 2% agaroznom gelu po proceduri opisanoj u poglavlju 3.8.3. Dobijeni PCR proizvodi su, u zavisnosti od jačine signala na gelu, razblaženi 50-400 puta, zatim denaturisani pomoću Hi-Dye formamida na temperaturi 95°C i na kraju razdvajani kapilarnom elektroforezom u ABI Prism 3130 automatskom sekvenceru. Veličina fragmenata je određivana na osnovu GeneScan-500 LIZ standarda (Applied Biosystems, SAD) koji je dodat svakom uzorku pre denaturacije. Mikrosateliti su na kraju analizirani pomoću GeneMapper programa (Applied Biosystems, SAD).

Kao referentni uzorak za DNK izolovanu iz rezistentnih ćelija korišćena je DNK izolovana iz odgovarajućih senzitivnih ćelija. Marker je definisan kao

neinformativan ukoliko je detektovan samo jedan alelski pik u DNK uzorku senzitivnih parentalnih ćelija (homozigot). S druge strane, marker je posmatran kao informativan i dalje je analiziran kada su postojala dva glavna alelska pika u DNK uzorku senzitivnih parentalnih ćelija (heterozigot). Ukoliko kod informativnih slučajeva kod rezistentih ćelija dolazi do potpunog ili delimičnog gubitka jednog od alelskih pikova onda se taj uzorak smatra kandidatom za gubitak heterozigotnosti analiziranog lokus. Kao meru stepena gubitka heterozigotnosti program automatski izračunava LOH skor prema jednačini $(\text{visina pika normalnog alela 2}) / (\text{visina pika normalnog alela 1})$ podeljeno sa $(\text{visina pika tumorskog alela 2}) / (\text{visina pika tumorskog alela 1})$. Smatra se da je kod rezistentnih ćelija došlo do gubitka heterozigotnosti ukoliko je ovaj odnos manji od 0,66 ili veći od 1,5.

3.18. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati dobijeni u eksperimentima (inhibicije ćelijskog rasta, protočne citofluorometrije, RT-PCR-a, akumulacije Rho 123 i doksorubicina, kao i određivanja koncentracije GSH i VEGF) su analizirani u programu STATISTICA 6.0. Na grupama podataka sa normalnom raspodelom, primenjena je analiza varijance (one-way ANOVA). Nakon uočene statističke značajnosti tretmana, primenjen je Tukey honest (HSD) test. Grupe podataka koje nisu imale normalnu raspodelu, analizirane su neparametarskim U-testom. Uočene razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je stepen verovatnoće bio $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. POSTEPENO IZAZIVANJE REZISTENCIJE RASTUĆIM KONCENTRACIJAMA PAKLITAKSELA

4.1.1. Selekcionisanje DLD1-TxR ćelija

Senzitivnost DLD1 ćelijske linije na PTX utvrđena je SRB testom. Dobijena IC_{50} vrednost za PTX - 40 nM je u procesu postepenog izazivanja rezistencije korišćena kao početna koncentracija. Ćelije su podvrgnute selektivnom pritisku rastućih koncentracija PTX-a (40, 120, 180 i 240 nM) prilikom pasažiranja, koje je vršeno 2 puta u toku jedne nedelje: nakon 72 h i nakon narednih 96 h. Ćelijama je omogućeno da se u toku sledeće pasaže (72 h) oporave od tretmana, a potom je nastavljen tretman višom koncentracijom. Nakon prvog ciklusa tretmana rastućim koncentracijama PTX-a, ćelije su oslobođene dejstva PTX-a (72 h) u čistom medijumu, kako bi se SRB testom uporedilo dejstvo PTX-a između parentalne (polazne) ćelijaske linije (DLD1) i ćelija podvrgnutih selektivnom pritisku, označenih kao *DLD1/240 nM PTX*. Uočena je razlika u dejstvu PTX-a između DLD1 i *DLD1/240 nM PTX* ćelija i postignuta rezistencija, izražena faktorom rezistencije, je iznosila 4,3 (Tabela 6).

Selektivni pritisak je nastavljen. U narednom ciklusu indukcije rezistencije, ćelije su tretirane sa 360 nM PTX-a, takođe 2 puta u toku jedne nedelje. Zatim je ćelijama omogućeno da se u toku jedne pasaže (72 h) oporave od tretmana, koji je zatim nastavljen prema opisanoj shemi (još 2 puta u toku nedelju dana). Pred eksperiment, *DLD1/360 nM PTX* ćelije su oslobođene dejstva PTX-a (72 h) i SRB testom je upoređeno dejstvo PTX-a između datih ćelija i intaktne linije (DLD1). Relativna rezistencija sa faktorom 15,0, tri puta je veća u odnosu na prethodni stadijum indukcije rezistencije (Tabela 6).

Tretman sa 480 nM PTX-a je sproveden, kao i pri prethodnoj koncentraciji, 2 puta u toku jedne nedelje. Ponovo je ćelijama omogućeno da se u toku jedne pasaže (72 h) oporave, da bi nakon toga bile tretirane istom koncentracijom još 2 puta u toku nedelju dana. Pred eksperiment, *DLD1/480 nM PTX* ćelije su oslobođene dejstva PTX-a (72 h) i SRB testom je upoređeno dejstvo PTX-a između datih ćelija i intaktne linije

(DLD1). Faktor rezistencije je nešto veći i u ovom stadijumu indukcije rezistencije iznosi 26,6 (Tabela 6).

Poslednja u nizu rastućih koncentracija PTX-a (600 nM) je primenjena isto kao 360 i 480 nM. SRB test je pokazao da postoji veoma značajna razlika u dejstvu PTX-a na DLD1 i *DLD1/600 nM PTX* ćelije sa faktorom rezistencije 162 (Tabela 6).

Tabela 6. Porast faktora rezistencije pri kontinuiranom tretmanu paklitakselom kod DLD1 ćelijske linije

Kontinuirani tretman paklitakselom	Faktor rezistencije
DLD1/240 nM PTX	4,3
DLD1/360 nM PTX	15,0
DLD1/480 nM PTX	26,6
DLD1/600 nM PTX	162

DLD1/600 nM PTX ćelije su u budućim eksperimentima označene kao DLD1-TxR rezistentna linija potekla od senzitivne, parentalne linije – DLD1. Step en rezistencije na PTX se kod DLD1-TxR ćelija ne menja kada se mesec dana gaje u čistom medijumu bez selektivnog pritiska PTX-a.

4.1.2. Selekcionisanje U87-TxR ćelija

Senzitivnost U87 ćelijske linije je takođe određena SRB testom. Prvo je utvrđena IC_{50} vrednost za PTX, koji iznosi 90 nM, a potom je započeto postepeno izazivanje rezistencije. Prvi ciklus tretmana je obuhvatao 3 koncentracije PTX-a: 90, 120 i 150 nM. Ćelije su tretirane 2 puta u toku jedne nedelje, zatim je ćelijama omogućeno da se oporave u toku jedne pasaže (72 h), da bi nakon toga bile tretirane višom koncentracijom PTX-a. Ćelije su potom oslobođene dejstva PTX-a (72 h) i SRB testom je upoređeno dejstvo PTX-a između intaktne linije (U87) i *U87/150 nM PTX*. Uočava se razlika u dejstvu PTX-a između intaktne linije (U87) i *U87/150 nM PTX* sa faktorom rezistencije 2,5 (Tabela 7).

Naredni ciklus tretmana je obuhvatao još 3 koncentracije PTX-a: 180 nM, 210 nM i 240 nM. Ćelije su tretirane prema već opisanoj shemi: dva puta u toku nedelju dana, oporavak u toku jedne pasaže i tretman sledećom, višom koncentracijom. Pred eksperiment, *U87/240 nM PTX* ćelije su oslobođene dejstva PTX-a (72 h) i SRB testom je upoređeno dejstvo PTX-a između datih ćelija i intaktne linije (U87). Relativna rezistencija sa faktorom 15,7, šest puta je veća u odnosu na prethodni stadijum indukcije rezistencije (Tabela 7).

Poslednja u nizu restućih koncentracija PTX-a (300 nM) je primenjena po nešto drugačijoj shemi nego ostale koncentracije. Ćelije su tretirane 2 puta u toku nedelju dana, a zatim je oporavak trajao kroz dve pasaže. Ovaj ciklus tretmana i oporavka je ponovljen još 4 puta. Nakon toga ćelije su oslobođene dejstva PTX-a (72 h) i SRB test je pokazao da postoji veoma značajna razlika u dejstvu PTX-a na U87 i *U87/300 nM PTX* ćelije sa faktorom rezistencije 104 (Tabela 7).

Tabela 7. Porast faktora rezistencije pri kontinuiranom tretmanu paklitakselom kod U87 ćelijske linije

Kontinuirani tretman paklitakselom	Faktor rezistencije
U87/150 nM PTX	2,5
U87/240 nM PTX	15,7
U87/300 nM PTX	104

U87/300 nM PTX ćelije su u budućim eksperimentima označene kao U87-TxR rezistentna linija potekla od senzitivne, parentalne linije – U87. Stepen rezistencije na PTX se kod U87-TxR ćelija ne menja kada se mesec dana gaje u čistom medijumu bez selektivnog pritiska PTX-a.

4.2. UTVRĐIVANJE PRISUSTVA MDR FENOTIPA U NOVIM REZISTENTNIM LINIJAMA

Relativna rezistencija DLD1-TxR i U87-TxR ćelija na nekoliko hemioterapeutika sa različitim mehanizmom delovanja određena je SRB testom. IC₅₀

vrednosti za date hemioterapeutike kod parentalne i rezistentne linije, kao i faktori rezistencije prikazani su u Tabeli 8. IC₅₀ vrednosti za PTX kod DLD1 i DLD1-TxR ćelija su 0,04 µM i 6,47 µM, a faktor rezistencije je 162. U87-TxR ćelije su 104 puta rezistentnije na PTX od U87 ćelija sa IC₅₀ vrednostima 0,09 µM za U87 i 9,36 µM za U87-TxR. Značajna ukrštena-rezistencija kod DLD1-TxR ćelija je dobijena na vinblastin (VBL, faktor rezistencije 20), epirubicin (EPI, faktor rezistencije 24), doksorubicin (DOX, faktor rezistencije 14) i etoposid (VP-16, faktor rezistencije 28). Slaba ukrštena-rezistencija je prisutna na cisplatin (CPt), sa faktorom rezistencije 3,2. Kod U87-TxR ćelija značajna ukrštena-rezistencija je dobijena samo na vinblastin (VBL), sa faktorom rezistencije 52, dok je slaba ukrštena-rezistencija prisutna na epirubicin (EPI, faktor rezistencije 2,7), doksorubicin (DOX, faktor rezistencije 2,8), etoposid (VP-16, faktor rezistencije 1,9) i cisplatin (CPt, faktor rezistencije 1,7).

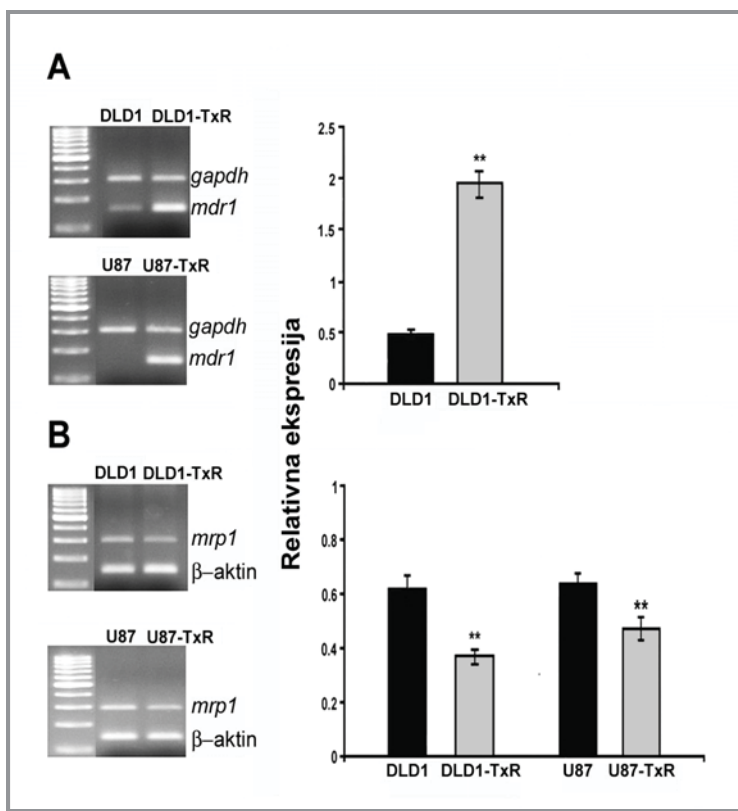
Tabela 8. Rezistencija DLD1-TxR i U87-TxR ćelija na različite hemioterapeutike

Hemioterapeutici	IC ₅₀ (µM)		Faktor rezistencije	IC ₅₀ (µM)		Faktor rezistencije
	DLD1	DLD1-TxR		U87	U87-TxR	
PTX	0,04	6,47	162	0,09	9,36	104
VBL	0,01	0,2	20	0,006	0,31	52
EPI	0,22	5,24	24	0,16	0,43	2,7
DOX	0,3	4,06	14	0,34	0,94	2,8
VP-16	1,32	36,99	28	4,14	8,06	1,9
CPt	7,2	23,24	3,2	5,06	8,5	1,7

4.3. ANALIZA EKSPRESIJE MDR GENA

Nivo ekspresije *mdr1* i *mrp1* gena analiziran je RT-PCR metodom kod uzoraka RNK izolovanih iz DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelija (Slika 9). Ekspresija *mdr1* gena je 4 puta viša kod DLD1-TxR ćelija u odnosu na DLD1 ćelije (Slika 9A). Kod U87-TxR ćelija ekspresija *mdr1* gena je izrazita u odnosu na U87 ćelije, gde je ekspresija *mdr1* gena nemerljiva (Slika 9B). Zanimljivo, MDR fenotip kod obe ćelijske linije, DLD1-TxR

i U87-TxR, odlikuje se smanjenjem ekspresije *mrp1* gena u odnosu na ekspresiju kod njihovih odgovarajućih parentalnih linija za 40%, odnosno 26% (Slika 9A, B).

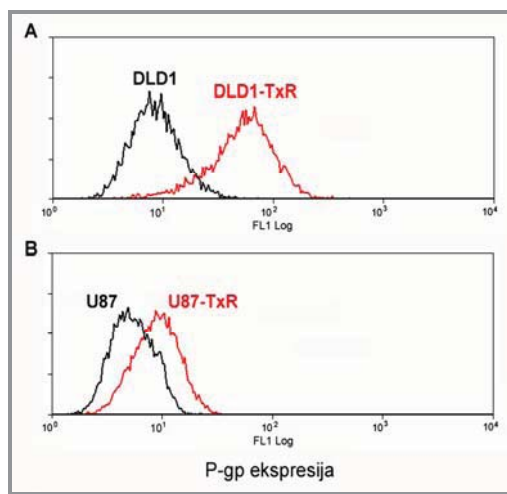


Slika 9. Ekspresija MDR gena kod parentalnih i rezistentnih ćelija. RT-PCR analiza ekspresije *mdr1* (A) i *mrp1* (B) iRNK kod DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelija. Ko-amplifikacija je izvršena sa *gapdh* ili β -aktin-om, kao internim kontrolama. Relativna ekspresija *mdr1* (A) i *mrp1* (B) gena je preračunata u odnosu na ekspresiju *gapdh*, odnosno β -aktin. Amplifikovani uzorci su razdvojeni na agaroznom gelu pored DNK lestvice (100 bp). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti dobijene iz najmanje 5 nezavisnih eksperimenata. Rezultati su smatrani statistički značajnim ukoliko je $p < 0,01$ (**).

4.4. ANALIZA EKSPRESIJE P-GLIKOPROTEINA

Metoda protočne citofluorimetrije je korišćena za određivanje nivoa ekspresije P-gp-a u parentalnim i rezistentnim ćelijama (Slika 10). Promena u ekspresiji proteina je analizirana direktno obeleženim antitelom za P-gp. Nakon što je određen osnovni nivo fluorescence (eng. „fluorescence background”) sa kontrolnim, izotipskim antitelom, određen je udeo P-gp pozitivnih ćelija u svakom uzorku. Uočava se značajno

povećanje P-gp pozitivnih ćelija kod DLD1-TxR i U87-TxR ćelija za u odnosu na njihove parentalne ćelije: DLD1 i U87 (slika 10A, B) .



Slika 10. P-gp ekspresija kod parentalnih i rezistentnih ćelijskih linija. Analiza ekspresije P-gp-a kod DLD1 i DLD1-TxR ćelija (A) i kod U87 i U87-TxR ćelija (B). Procenat P-gp pozitivnih ćelija (obojenih direktno obeleženim antitelom za P-gp) je određen nakon eliminacije ćelija koje su obojene FITC-obeležanim izotipskim antitelom.

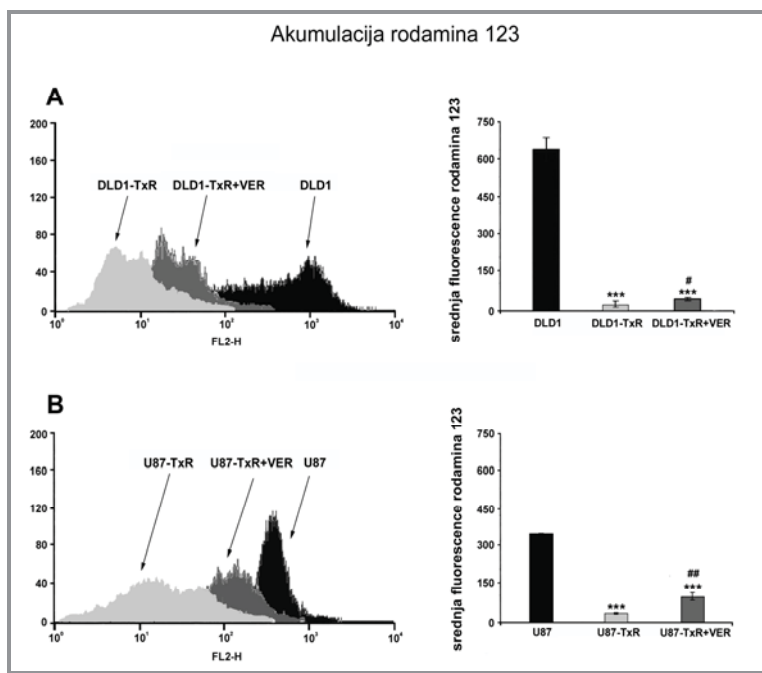
4.5. POJEDINAČNI NUKLEOTIDNI POLIMORFIZMI *MDR1* GENA

Prisustvo pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama u *mdr1* genu kod rezistentnih linija utvrđeno je pomoću Taqman FAM/VIC - MGB sistema za diskriminaciju alela. Analiza je pokazala da ne postoji prisustvo polimorfizama u *mdr1* genu kod DLD1-TxR ćelija, dok je kod U87-TxR ćelija detektovano heterozigotna mutacija na poziciji 3435C>T.

4.6. ANALIZA AKTIVNOSTI P-GLIKOPROTEINA

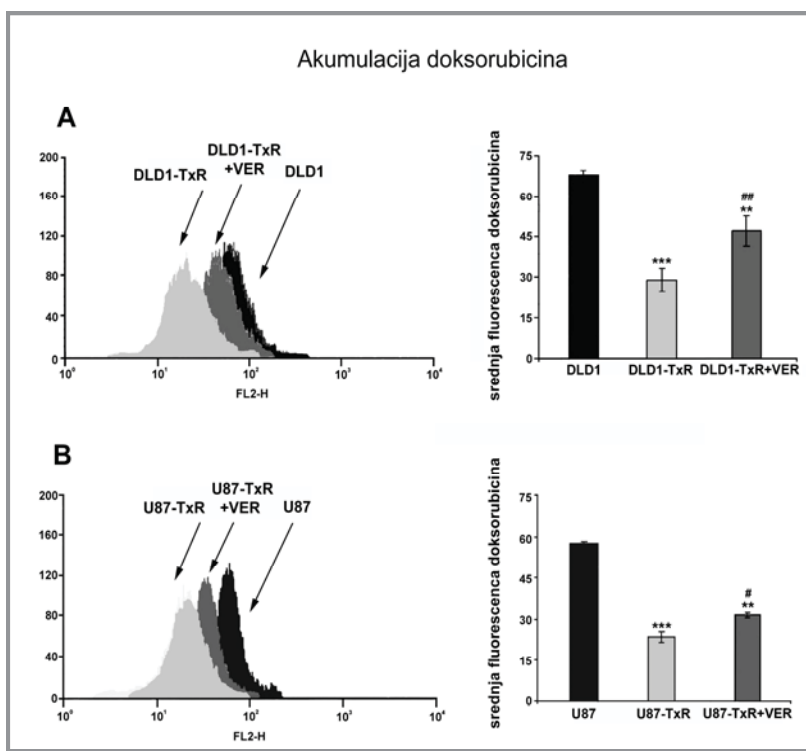
Provera aktivnosti P-gp pumpe, čija je ekspresija prethodno utvrđena na nivou iRNK i proteina, utvrđena je metodom protočne citofluorimetrije merenjem unutarćelijske akumulacije P-gp supstrata (Rho 123 i DOX) u parentalnim i rezistentnim ćelijama. Kao što je prikazano na slici 11A akumulacija Rho 123 je 26 puta manja kod DLD1-TxR ćelija u odnosu na DLD1 ćelije, dok je akumulacija Rho

123 kod U87-TxR ćelija 10 puta manja nego kod U87 ćelija (Slika 11B). Verapamil (VER), korišćen kao pozitivna kontrola tj. inhibitor P-gp aktivnosti, pri koncentraciji 5 μ M, povećava akumulaciju Rho 123 kod rezistentnih ćelija (Slika 11A, B).



Slika 11. Aktivnost P-gp-a u rezistentnim linijama - Razlika u akumulaciji Rho123 između parentalnih i rezistentnih ćelija. Analiza akumulacije Rho 123 (5 μ M) nakon 30 minuta kod DLD1 i DLD1-TxR ćelija (A) i U87 i U87-TxR ćelija (B). Pri istovremenom tretmanu sa VER dolazi do značajnog povećanja akumulacije Rho 123 kod rezistentnih linija (A i B). Statistička značajnost između parentalnih i rezistentnih ćelijskih linija je prikazana kao $p < 0,001$ (***), a između netretiranih rezistentnih ćelija i tretiranih VER-om, kao $p < 0,05$ (#) i $p < 0,01$ (##).

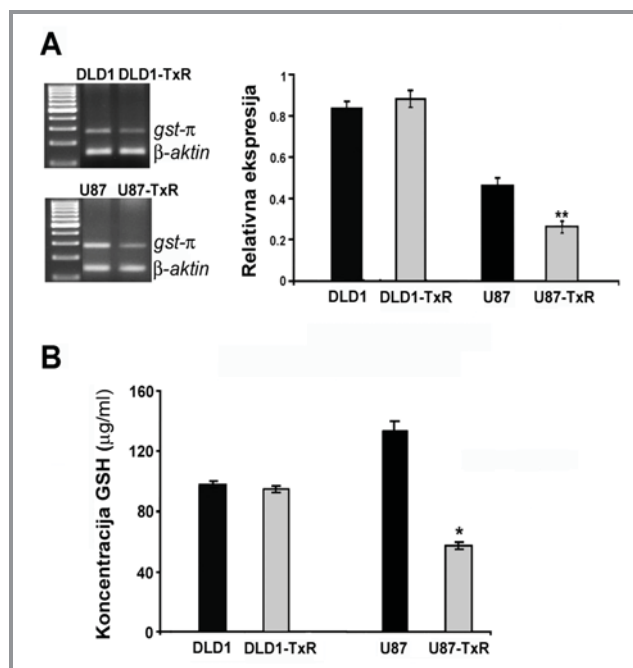
Akumulacija DOX-a kod DLD1-TxR i U87-TxR ćelija je 2 puta manja u odnosu na parentalne ćelije (slika 12A, B). Tretman sa 5 μ M VER povećava akumulaciju DOX-a za 1,6, odnosno 1,3 puta kod DLD1-TxR i U87-TxR ćelija (slika 12A, B).



Slika 12. Aktivnost P-gp-a u rezistentnim linijama - Razlika u akumulaciji DOX-a između parentalnih i rezistentnih ćelija. Analiza akumulacije DOX-a (20 μ M) nakon 120 minuta kod DLD1 i DLD1-TxR ćelija (A) i U87 i U87-TxR ćelija (B). Pri istovremenom tretmanu sa VER dolazi do značajnog povećanja akumulacije DOX-a kod rezistentnih linija (A i B). Statistička značajnost između parentalnih i rezistentnih ćelijskih linija je prikazana kao $p < 0,001$ (***), a između netretiranih rezistentnih ćelija i tretiranih verapamilom, kao $p < 0,05$ (#) i $p < 0,01$ (##).

4.7. GLUTATIONSKI DETOKSIFIKACIONI SISTEM

Uloga GSH detoksifikacionog sistema u nastanku MDR-a određena je na nivou ekspresije *gst- π* gena RT-PCR metodom (Slika 13A) i koncentracije GSH u parentalnim i rezistentnim ćelijama (Slika 13B). Ekspresija *gst- π* gena kod DLD1-TxR ćelija se ne razlikuje od ekspresije u DLD1 ćelijama (Slika 13A). Kao što je prikazano na slici 13B, ni koncentracija GSH se ne razlikuje između DLD1 (97 μ g/ml) i DLD1-TxR ćelija (95 μ g/ml). Međutim, ekspresija *gst- π* gena kod U87-TxR ćelija je manja za 43% u odnosu na U87 ćelije (Slika 13A), dok nastanak MDR-a kod U87-TxR ćelija izaziva i značajno smanjenje koncentracije GSH sa 134 μ g/ml kod U87 ćelija na 57 μ g/ml kod U87-TxR ćelija (Slika 13B).

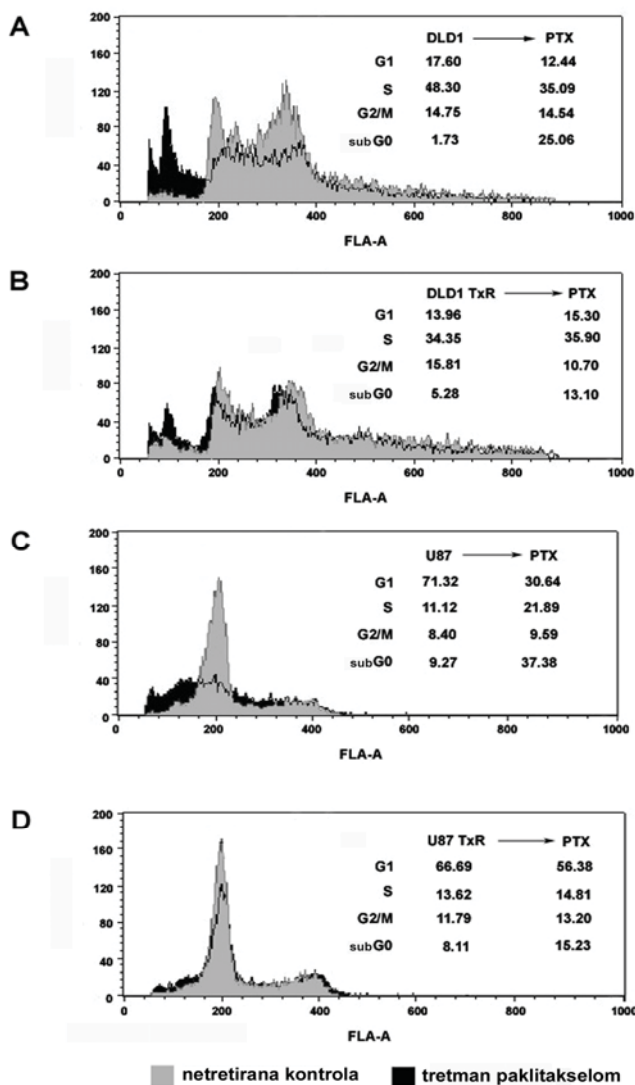


Slika 13. Analiza ekspresije *gst-π* gena i koncentracije GSH. Ispitan je nivo ekspresije *gst-π* gena kod DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelija (A). Ko-amplifikacija je izvršena sa β -aktin-om kao internom kontrolom, a relativna ekspresija *gst-π* gena (A) je preračunata u odnosu na ekspresiju β -aktin-a. Amplifikovani uzorci su razdvojeni na agaroznom gelu pored DNK lestvice (100 bp). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti dobijene iz najmanje 5 nezavisnih eksperimenata. Rezultati su smatrani statistički značajnim ukoliko je $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**). Redukovani GSH je analiziran kod DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelija (B). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti dobijene iz 4 nezavisna eksperimenta. Rezultati su smatrani statistički značajnim ukoliko je $p < 0,05$ (*).

4.8. UTICAJ TRETMANA PAKLITAKSELOM NA ĆELIJSKI CIKLUS KOD PARENTALNIH I REZISTENTNIH LINIJA

Promene ćelijskog ciklusa nakon tretmana PTX-om kod parentalnih i rezistentnih ćelija praćene su metodom protočne citofluorimetrije (Slika 14). Prvo je upoređena distribucija ćelijskog ciklusa između parentalne i rezistentne ćelijske linije. Citofluorometrijski profil pokazuje značajno smanjenje procentualne zastupljenosti ćelija u G1 i S fazi kod DLD1-TxR ćelija u odnosu na DLD1 ćelije (Slika 14A, B). Udeo mrtvih ćelija u subG0 fazi je povećan kod DLD1-TxR ćelija (Slika 14A, B). Analiza ćelijskog ciklusa pokazuje smanjenje broja ćelija u G1 fazi i povećanje broja ćelija u G2/M fazi kod U87-TxR ćelija u odnosu na U87 ćelije (Slika 14C, D).

Primena jednokratnog PTX tretmana kod parentalnih ćelijskih linija karcinoma debelog creva i glioblastoma značajno menja distribuciju ćelijskog ciklusa. Tako PTX dovodi do akumulacije DLD1 ćelija u subG0 fazi, dok su razlike u fazama ćelijskog ciklusa potpuno izbrisane kod U87 ćelija (Slika 14A, C). Tretman PTX-om takođe povećava procentualnu zastupljenost DLD1-TxR ćelija u subG0 fazi (Slika 14B), ali ta promena nije toliko izražena kao kod DLD1 ćelija (Slika 14A). Kod U87-TxR ćelija tretman PTX-om je praćen samo smanjenjem broja ćelija u G1 fazi (Slika 14D).



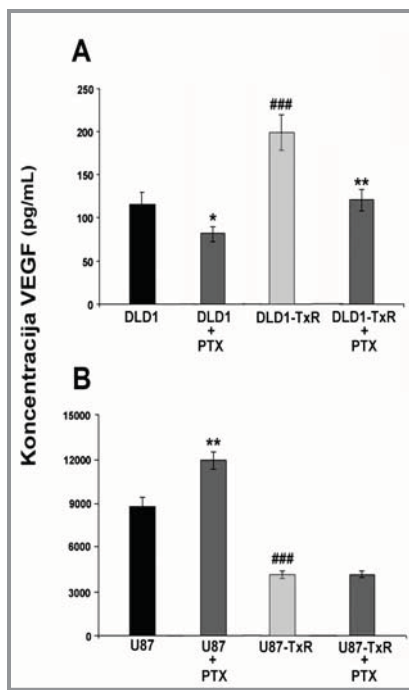
Slika 14. Promene u distribuciji ćelijskog ciklusa kod ćelijskih linija karcinoma debelog creva i glioblastoma nakon pojedinačnog i kontinuiranog tretmana PTX-om.

Nesinhronizovane parentalne i rezistentne ćelije su inkubirane u kompletnom medijumu i tretirane PTX-om u trajanju od 72 h. DLD1 ćelije su tretirane sa 20 nM PTX-a (A), dok su DLD1-TxR ćelije tretirane sa 500 nM PTX-a (B). U87 ćelije su tretirane sa 50 nM PTX-a (C), dok su U87-TxR ćelije tretirane sa 500 nM PTX-a (D). Y-osa: relativan broj ćelija, X-osa: DNK sadržaj utvrđen propidijum jodidom. Procenat ćelija u G1, S, G2/M i subG0 fazi je preuzet iz jednog reprezentativnog eksperimenta.

4.9. UTICAJ PAKLITAKSELA NA SEKRECIJU VEGF-a

Delovanje PTX-a na sekreciju VEGF-a, glavnog faktora koji stimulise proces tumorske angiogeneze, je ispitano na parentalnim i rezistentnim ćelijskim linijama (Slika 15). PTX značajno smanjuje sekreciju VEGF-a kod DLD1 ćelija sa 116 pg/mL na 81 pg/mL (Slika 15A), dok je kod DLD1-TxR ćelija značajno povećava sekreciju VEGF-a u odnosu na parentalnu liniju (Slika 15A). Međutim, tretman PTX-om kod DLD1-TxR ćelija takođe smanjuje sekreciju VEGF-a sa 199 pg/mL na 121 pg/mL (Slika 15A).

MDR fenotip kod ćelijske linije glioblastoma odlikuje se značajnim smanjenjem sekrecije VEGF-a. Kod U87-TxR ćelija, sekrecija VEGF-a je dva puta manja nego kod U87 ćelija (Slika 15B). Jednokratni tretman PTX-om značajno povećava sekreciju VEGF-a kod U87, dok se sekrecija VEGF-a ne menja nakon jednokratnog tretmana PTX-om kod U87-TxR ćelija (Slika 15B).

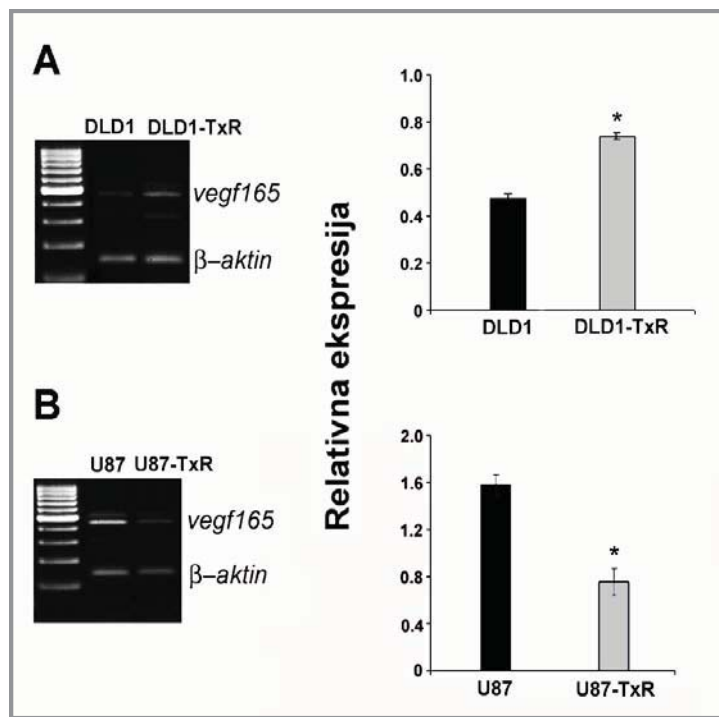


Slika 15. Promene u sekreciji VEGF-a nakon tretmana PTX-om. DLD1 i DLD1-TxR ćelije su tretirane sa IC_{50} vrednostima za PTX, 40 nM, odnosno 6,5 μ M (A). U87 i U87-TxR ćelije su tretirane sa IC_{50} vrednostima za PTX, 90 nM, odnosno 9 μ M (B). Srednje vrednosti su dobijene iz 2 nezavisna eksperimenata urađena u triplikatu. Statistički značajno dejstvo PTX-a u odnosu na netretiranu kontrolu je prikazano kao: $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**). Statistička značajnost

između netretiranih rezistentnih i netretiranih senzitivnih ćelija je prikazano kao: $p < 0,001$ (###).

4.10. ANALIZA EKSPRESIJE *VEGF165* iRNK

Nivo ekspresije *vegfl65* iRNK analiziran je RT-PCR metodom kod DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelija (slika 16). DLD1-TxR ćelije imaju 1,5 puta veću sintezu *vegfl65* iRNK u odnosu na DLD1 ćelije (slika 16A). Ekspresija *vegfl65* iRNK kod U87 ćelija je manja za 52% u odnosu na U87 ćelije (slika 16B). Razlike na nivou ekspresije *vegfl65* iRNK između parentalnih i rezistentnih linija su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na nivou VEGF sekrecije.



Slika 16. Ekspresija *vegfl65* iRNK kod parentalnih i rezistentnih ćelija. Analiza ekspresije *vegfl65* iRNK kod DLD1 i DLD1-TxR (A) i kod U87 i U87-TxR ćelija (B). Koamplifikacija je izvršena sa β -aktin-om kao internom kontrolom. Amplifikovani uzorci su razdvojeni na agaroznom gelu pored DNK lestvice (100 bp). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti dobijene iz najmanje 5 nezavisnih eksperimenata. Rezultati su smatrani statistički značajnim ukoliko je $p < 0,05$ (*).

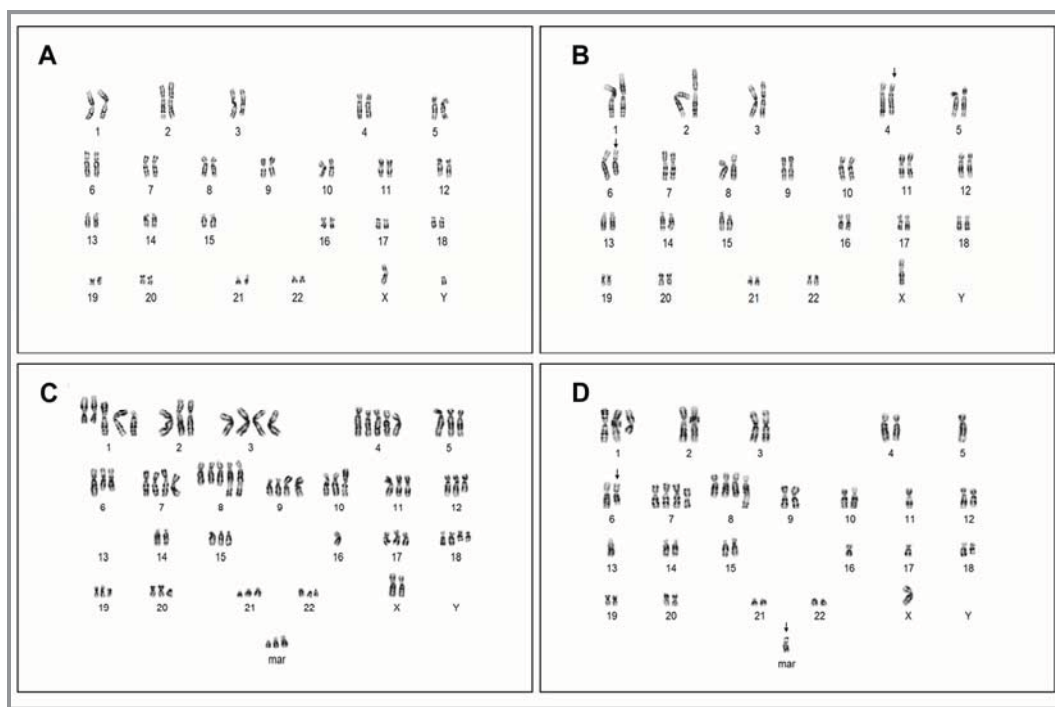
4.11. CITOGENETSKA ANALIZA

Za određivanje strukture i broja hromozoma kod senzitivnih i rezistentnih ćelijskih linija korišćene su tehnike bojenja G traka i invertovanog DAPI (4-6-diamidin-2-fenilindol) bojenja. Reprezentativni kariotipovi DLD1 i DLD1-TxR ćelija su prikazani na slici 17A, B. Obe ćelijske linije imaju strukturne aberacije kao što su der(2)dup(p14p22), del(6)(p25) i der(11)dup(p13.3p15.5). DLD1-TxR ćelije su stekle nove strukturne i numeričke aberacije kao što su gubitak hromozoma Y, del(4)(q35) i del(6)(q23.3q25.1) (Slika 17B).

Kariotipovi U87 i U87-TxR ćelija su prikazani na slici 17C, D. U87 ćelije imaju mnogobrojne strukturne i numeričke aberacije.

Citogenetska analiza U87 ćelija je pokazala triploidni kariotip 74(67-76),XX,-X,der(1)t(1;3)(p32;q21)x2,del(1)(q21),+del(1)(p13),+3,del(4q32),+del(4)(q32),del(6)(q23)x2,del(6)(p24),+7,der(8)t(8;?)(q24;?),+der(8)t(8;?)(q24;?),del(9)(p13)x2,der(9)add(9)(p24),+der(9)add(9)(p24),der(10)t(10;19)(p11.2;q11?)x2,der(10)t(10;13)(q10;q11),del(12)(q21.1),-13,-13,-13,-14,-16,-16,del(18)(q12.3),+del(18)(q12.3),+3mar.

U87-TxR ćelije su uglavnom zadržale strukturne hromozomske rearanžmane njihovih parentalnih ćelija, ali su kariotipovi većine ćelija (~90%) diploidni, odnosno praćeni su smanjenem nivou ploidije (Slika 17D). Ova istraživanja ukazuju da je sticanje MDR fenotipa kod dve ćelijske linije poreklom od različitih tipova kancera praćeno gubitkom genomske materijala 6q i Y hromozoma, kao i smanjenom poliploidije.

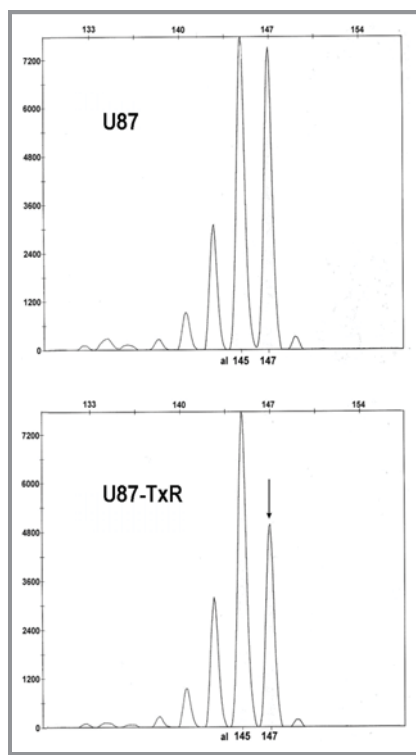


Slika 17. Citogenetski profili parentalnih i rezistentnih ćelijskih linija. Reprezentativni kariotipovi DLD1 (A), DLD1-TxR (B), U87 (C) i U87-TxR (D) ćelija dobijenih invertovanim DAPI-bojenjem. Strelice pokazuju nove strukturne hromozomske rearanžmane kod rezistentnih ćelija u odnosu na njihove odgovarajuće parentalne ćelije.

4.12. ANALIZA PROMENA U *P53* TUMOR SUPRESOR GENU

Najpre je ispitivano prisustvo mutacija *p53* tumor supresor gena kod U87-TxR ćelija i to u pet najčešće mutiranih egzona (egzoni 5 – 9) DNK sekvenciranjem. Analiza je pokazala da ne postoji prisustvo mutacija u *p53* genu kod U87-TxR ćelija.

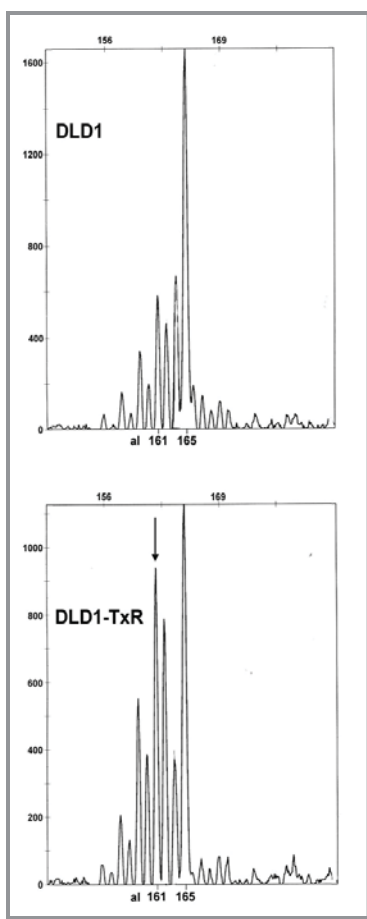
U daljem ispitivanju promena u *p53* tumor supresor genu kod U87-TxR ćelija, proučavana je pojava gubitka heterozigotnosti u odnosu na odgovarajuće parentalne U87 ćelije primenom fragmentne analize (Slika 18). Od 4 ispitivana mikrosatelitska lokusa, dva su bila neinformativna (TP53dinukleotid i TP53pentanukleotid), odnosno detektovan je samo jedan alelski pik u DNK uzorku kontrolnih, parentalnih ćelija (homozigot). U preostala dva informativna mikrosatelitska lokusa (D17S786 i D17S1537) detektovan je gubitak jednog alela kod U87-TxR ćelija u oba lokusa (Slika 18).



Slika 18. LOH analiza *p53* tumor supresor gena kod U87 i U87-TxR ćelija. Reprezentativni primer LOH analize D17S786 mikrosatelitskog markera *p53* gena kod U87-TxR ćelija u odnosu na U87 ćelije; strelica pokazuje gubitak alela 147 kod U87-TxR ćelija. Odnos alela za D17S786 mikrosatelitski marker između U87 i U87-TxR ćelija je 0,66.

4.13. ANALIZA PROMENA U *PTEN* TUMOR SUPRESOR GENU

Inaktivacija *PTEN* tumor supresora kod DLD1-TxR ćelija proučavana je analizom gubitka heterozigotnosti (Slika 19). Od 5 testiranih mikrosatelitskih markera *PTEN* gena, D10S579, D10S1765, D10S541, AFM086wg9 i D10S215, jedan je bio neinformativan (AFM086wg9), odnosno detektovan je samo jedan alelski pik u DNK uzorku kontrolnih, parentalnih ćelija. U preostala 4 informativna mikrosatelitska markera, kod D10S215 markera detektovan je LOH *PTEN*-a u DLD1-TxR ćelijama (Slika 19).



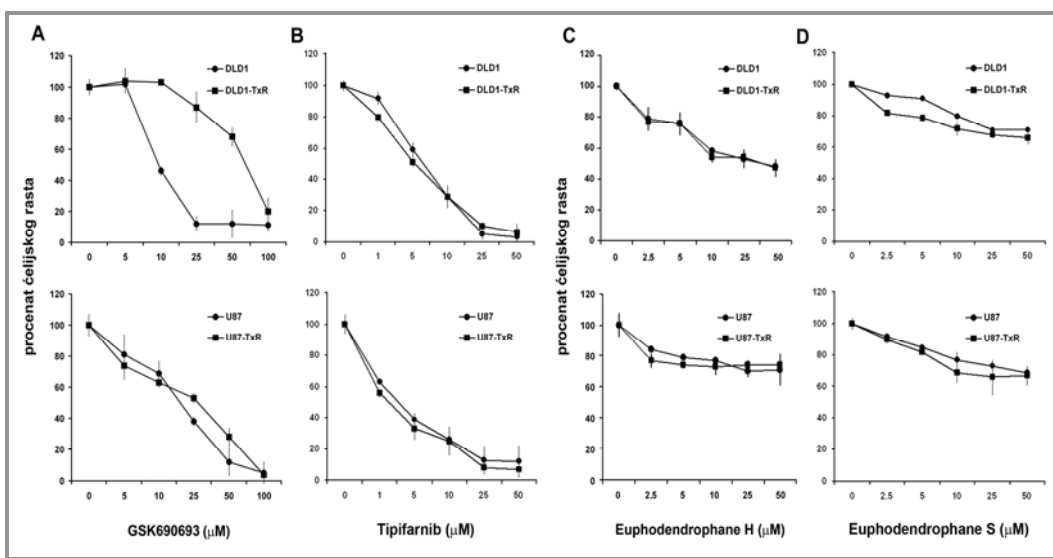
Slika 19. LOH analiza *PTEN* tumor supresor gena kod DLD1 i DLD1-TxR ćelija. Reprezentativni primer LOH analize D10S215 mikrosatelitskog markera *PTEN* gena kod DLD1-TxR ćelija u odnosu na DLD1 ćelije; strelica pokazuje gubitak alela 161 kod DLD1-TxR ćelija. Odnos alela za D10S215 mikrosatelitski marker između DLD1 i DLD1-TxR ćelija je 2,38.

4.14. TESTIRANJE NOVIH SUPSTANCI U MDR MODELIMA

Na osnovu dobijenih promena izazvanih indukcijom rezistencije, izabrane su supstance sa specifičnim mehanizmima dejstva za proveru vrednosti MDR modela u ispitivanju novih potencijalnih anti-kancer agenasa: Akt inhibitor-GSK690693, Ras inhibitor-tipifarnib i dva inhibitora P-glikoproteina – jatrofani Euph H i S. Njihov efekat na ćelijski rast parentalnih i rezistentnih linija je utvrđen SRB testom (Slika 20). Prisustvo MDR fenotipa smanjilo je efikasnost GSK690693 kod DLD1-TxR ćelija u odnosu na odgovarajuće parentalne ćelije (Slika 20A). IC₅₀ vrednosti za GSK690693 kod DLD1 i DLD1-TxR ćelija su 9,6 μ M i 68,8 μ M, sa faktorom rezistencije 7,1. Za razliku od njih, GSK690693 je imao sličan efekat na inhibiciju ćelijskog rasta kod U87 i U87-TxR ćelija (Slika 20A).

Tipifarnib je pokazao značajan potencijal za inhibiciju ćelijskog rasta kod svih ćelijskih linija, bez obzira na prisustvo MDR fenotipa (Slika 20B). IC₅₀ vrednosti su bile između 2 i 6,5 μ M.

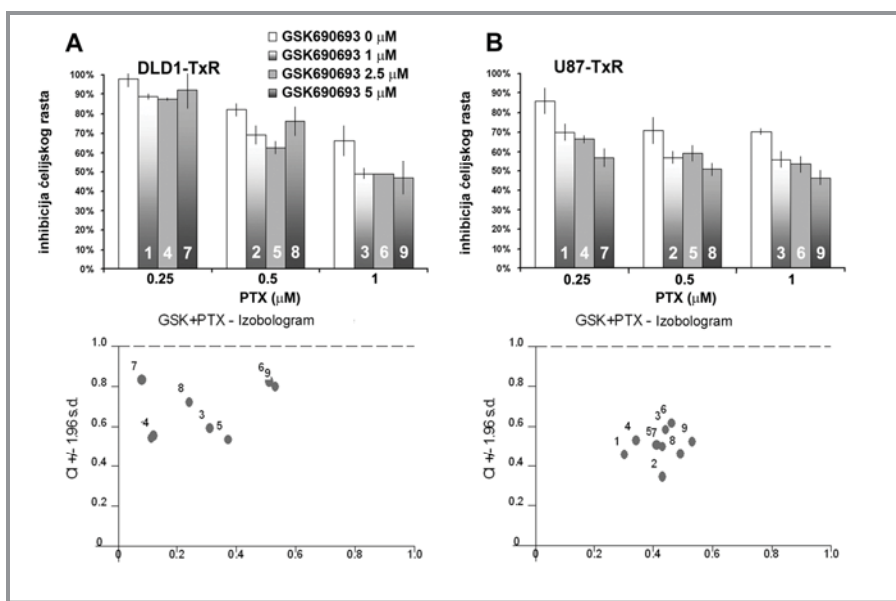
Dva prirodna proizvoda, koji pripadaju jatrofanskim diterpenoidima (Euph H i S), su pokazala značajno manji inhibicioni efekat kod svih testiranih ćelijskih linija (Slika 20C, D).



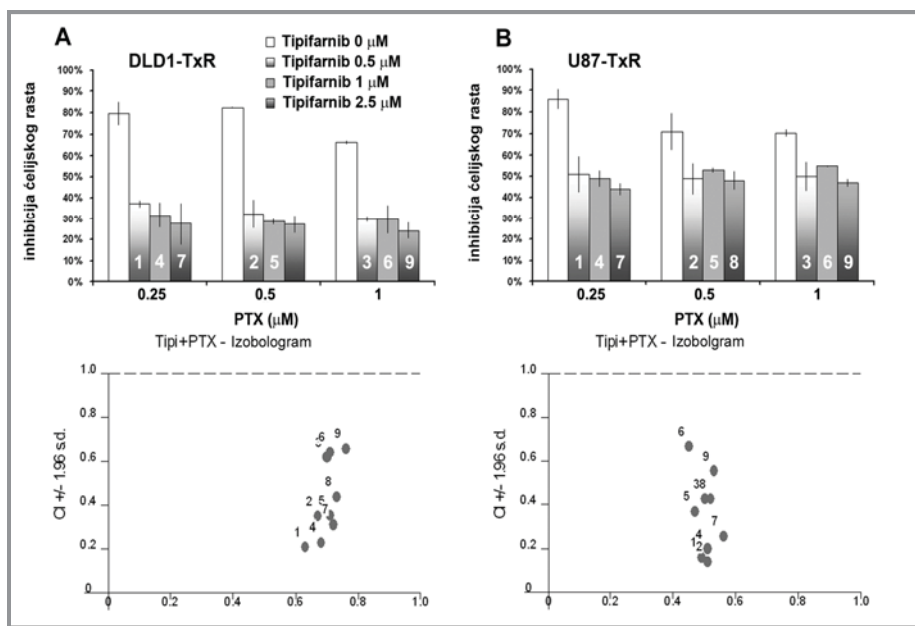
Slika 20. Efikasnost različitih droga na parentalnim i rezistentnim linijama tj. u MDR modelima. Inhibicija ćelijskog rasta kod DLD1, DLD1-TxR, U87 i U87-TxR ćelija pod dejstvom GSK690693 (A), Tipifarniba (B), Euph H (C) i Euph S (D). Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5).

4.15. KOMBINACIJE GSK690693 I TIPIFARNIBA SA PAKLITAKSELOM

Efekat istovremenog tretmana GSK690693 i Tipifarniba sa PTX-om na MDR ćelijskim linijama utvrđen je SRB testom. Ćelije su tretirane 72 h sa 1, 2,5 i 5 μM GSK690693 u kombinaciji sa 0,05-1 μM PTX-a. Tipifarnib je kombinovan sa istim opsegom koncentracija PTX-a u sledećim koncentracijama: 0,5, 1 i 2.5 μM . Oba jedinjenja su povećala senzitivnost MDR ćelijskih linija na PTX (Slika 21A, B; Slika 22A, B). Priroda uzajamnog dejstva GSK690693 i PTX-a, kao i Tipifarniba i PTX-a utvrđena je pomoću kombinacionog indeksa (CI) koji se dobija složenim proračunima efekta testiranih supstanci. Dobijeni rezultati ukazuju na sinergistički efekat ($\text{CI} < 1$) pri svim testiranim kombinacijama supstanci (kombinacije su obeležene sa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9 na prikazanim histogramima i izobologramima).



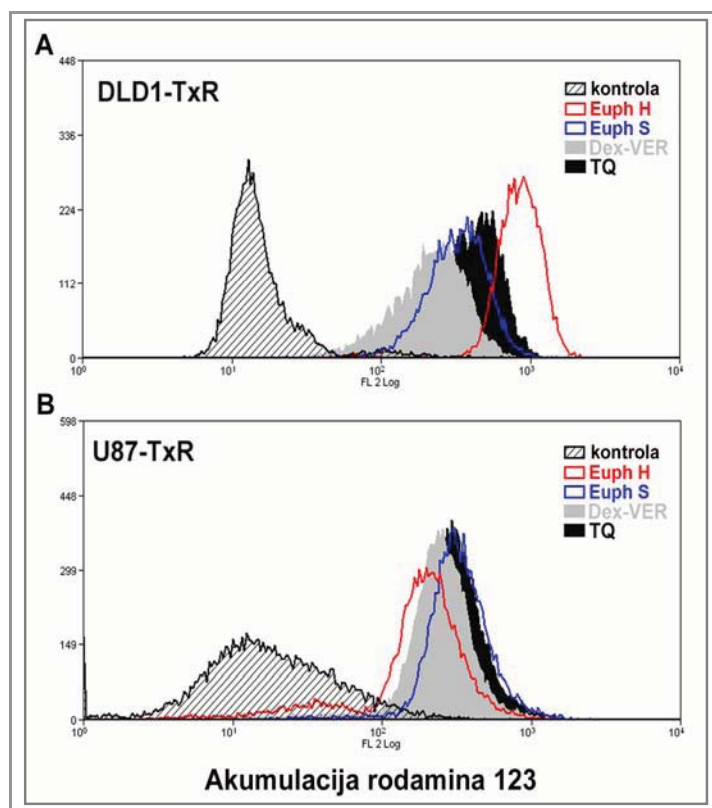
Slika 21. Istovremeno kombinovanje GSK690693 sa PTX-om: efekat na inhibiciju ćelijskog rasta kod rezistentnih ćelija. Efekat istovremenog tretmana GSK690693 i PTX-a na inhibiciju ćelijskog rasta DLD1-TxR (A) i U87-TxR (B) ćelija, kao i priroda međudejstva dve droge (odgovarajući izobologrami). Efekat kombinacije droga (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9) je određen SRB testom. Srednje vrednosti su dobijene iz četiri ili više eksperimenata ($n \geq 4$). Interakcija između GSK690693 i PTX-a je određena primenom „CalcuSyn“ kompjuterskog softvera. Vrednosti $\text{CI} < 1$ ukazuju na sinergistički efekat.



Slika 22. Istovremeno kombinovanje Tipifarniba sa PTX-om: efekat na inhibiciju ćelijskog rasta kod rezistentnih ćelija. Efekat istovremenog tretmana Tipifarniba i PTX-a na inhibiciju ćelijskog rasta DLD1-TxR (A) i U87-TxR (B) ćelija, kao i priroda međudejstva dve droge (odgovarajući izobologrami). Efekat kombinacije droga (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9) je određen SRB testom. Srednje vrednosti su dobijene iz četiri ili više eksperimenata ($n \geq 4$). Interakcija između Tipifarniba i PTX-a je određena primenom „CalcuSyn“ kompjuterskog softvera. Vrednosti $CI < 1$ ukazuju na sinergistički efekat.

4.16. AKUMULACIJA RODAMINA 123 NAKON TRETMANA SA EUPH H I S

Efekat jatrofana Euph H i S na funkciju P-gp-a kod rezistentnih ćelijskih linija, analiziran je posredstvom unutarćelijske akumulacije P-gp supstrata (Rho 123). Metodom protočne citofluorimetrije određena je akumulacija Rho123 i upoređena nakon tretmana sa Euph H i S, TQ (nekompetitivni P-gp inhibitor) i Dex-Ver (kompetitivni P-gp inhibitor). Najveći porast u akumulaciji Rho 123 kod DLD1-TxR ćelija je uočen nakon tretmana sa Euph H (Slika 23A). Euph S je takođe efikasan u modulaciji P-gp-a, pokazujući sličan potencijal kao i TQ i Dex-VER (Slika 23A). Oba testirana jedinjenja (Euph H i S), zajedno sa pozitivnim kontrolama (TQ i Dex-VER) su imala sličan efekat na inhibiciju P-gp pumpe kod U87-TxR ćelija (Slika 23B).



Slika 23. Euph H i S povećavaju akumulaciju Rho 123 kod rezistentnih ćelija. Analiza akumulacije Rho 123 kod DLD1-TxR (A) i U87-TxR (B) ćelija netretiranih i tretiranih sa 5 μ M Euph H/S/Dex-VER i 50 nM TQ. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta.

4.17. REVERZIJA REZISTENCIJE NA PAKLITAKSEL

Potencijal supstanci (GSK690693, Tipifarnib, Euph H i S) da revertuju rezistenciju na PTX takođe je ispitan kod DLD1-TxR i U87-TxR ćelija (Tabela 9). Upoređivanje efekata pojedinačnih tretmana PTX-a sa kombinacijama izvršeno je SRB testom. Kao pozitivne kontrole za reverziju rezistencije na PTX korišćeni su TQ (nekompetitivni P-gp inhibitor) i Dex-Ver (kompetitivni P-gp inhibitor). Efikasnost testiranih supstanci u istovremenom tretmanu sa PTX-om (Tabela 9) vrednovana je pomoću koeficijenta „relativna reverzija”, koji predstavlja odnos između IC_{50} vrednosti za PTX i IC_{50} vrednosti dobijene kombinovanjem navedenih supstanci sa PTX-om. GSK690693 je pokazao slab potencijal za reverziju rezistencije na PTX, dok su Tipifarnib i EuphH/S značajno povećali senzitivnost MDR ćelija na PTX (Tabela 9).

IC₅₀ vrednost za PTX je smanjena sa 1811,05 nM na 63,24 nM kod DLD1-TxR ćelija nakon istovremenog tretmana sa Euph H (Tabela 9). Njegov potencijal za reverziju rezistencije (29 puta) je sličan potencijalu Dex-Ver-a (34 puta). Tipifarnib i TQ su pokazali značajno veći potencijal za reverziju rezistencije nego Euph H, sa koeficijentom relativne reverzije od 43, odnosno 76 (Tabela 9). Euph S je bio manje efikasan nego Euph H sa koeficijentom relativne reverzije od 10 (Tabela 9).

Sva testirana jedinjenja (osim GSK690693) zajedno sa pozitivnim kontrolama (TQ i Dex-Ver) su imala sličan potencijal za reverziju rezistencije na PTX kod U87-TxR (Tabela 9). Međutim, njihov koeficijent relativne reverzije je značajno manji kod U87-TxR ćelija nego kod DLD1-TxR ćelija.

Tabela 9. Relativna reverzija rezistencije na PTX u kombinaciji sa 2,5 μ M Tipifarniba, 5 μ M GSK690693, Euph H, Euph S, Dex-VER i 50 nM TQ

Ćelijska linija	Droga	IC ₅₀ (nM) za PTX	Koeficijent relativne reverzije
DLD1-TxR	PTX	1811,05 \pm 0,08	
	GSK690693 (+ PTX)	948,28 \pm 0,15	2
	Tipifarnib (+ PTX)	42,37 \pm 0,05	43
	Euph H (+ PTX)	63,24 \pm 0,09	29
	Euph S (+ PTX)	186,67 \pm 0,1	10
	Dex-VER (+ PTX)	53,45 \pm 0,05	34
	TQ (+ PTX)	23,50 \pm 0,04	76
U87-TxR	PTX	1236,00 \pm 0,03	
	GSK690693 (+ PTX)	625,00 \pm 0,07	2
	Tipifarnib (+ PTX)	137,50 \pm 0,80	9
	Euph H (+ PTX)	93,33 \pm 0,08	13
	Euph S (+ PTX)	175,00 \pm 0,02	7
	Dex-VER (+ PTX)	77,27 \pm 0,05	16
	TQ (+ PTX)	85,19 \pm 0,01	14,5

4.18. PROMENE U ĆELIJSKOM CIKLUSU NAKON TRETMANA JATROFANIMA (EUPH H/S) I PAKLITAKSELOM

Distribucija ćelijskog ciklusa nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana sa Euph H/S i PTX-om na MDR ćelijama praćena je metodom protočne citofluorimetrije (Tabela 10). Niže koncentracije PTX-a smanjile su procenat DLD1-TxR ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa (Tabela 10). Kombinovani tretmani su doveli do smanjenja G1 faze ćelijskog ciklusa, što je praćeno značajnim povećanjem udela mrtvih ćelija u subG0 fazi, dok pojedinačni tretmani sa Euph H/S nisu uticali na distribuciju ćelijskog ciklusa.

Niže koncentracije PTX-a povećale su procenat U87-TxR ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa (Tabela 10). Pojedinačni tretmani sa Euph H/S nisu uticali na kinetiku ćelijskog ciklusa, dok su kombinovani tretmani smanjili procenat ćelija u G1 fazi, a procenat mrtvih ćelija u subG0 fazi je povećan.

Tabela 10. Distribucija ćelijskog ciklusa nakon pojedinačnih i kombinovanih tretmana sa Euph H/S i PTX-om

Faze ćelijskog ciklusa (%)	DLD1-TxR						
	Kontrola	PTX 50 nM	PTX 200 nM	Euph H 5µM	Euph H 5µM + PTX 50 nM	Euph S 5µM	Euph S 5µM + PTX 200 nM
subG ₀	1,7± 0,5	3,7± 0,3	4,8±1,8	1,5±0,5	18,9±6,1	1,8±0,5	33,2±10,3
G ₁	64,3±5,5	58,9±5,1	55,7±4,8	66,0±5,6	43,6±4,2	62,3±5,3	30,1±3,4
S	11,4±1,0	12,0±1,1	15,1±1,3	9,0± 0,8	19,2±1,8	11,1±1,0	21,5±1,9
G ₂ /M	19,1±1,5	21,0±1,6	21,9±2,3	19,2±1,5	16,1±1,4	21,8±1,7	15,0±1,3

Faze ćelijskog ciklusa (%)	U87-TxR						
	Kontrola	PTX 100 nM	PTX 200 nM	Euph H 5µM	Euph H 5µM + PTX 100 nM	Euph S 5µM	Euph S 5µM + PTX 100 nM
subG ₀	2,0±0,5	3,5±0,7	3,7±0,8	1,5±0,5	20,8±5,6	3,0±0,7	21,7±6,9
G ₁	58,8±8,1	66,8±9,5	63,6±9,0	63,4±8,9	42,0±7,3	61,8±8,7	40,4±6,6
S	9,7±0,7	10,8±0,8	10,8±0,78	10,2±0,7	13,2±0,9	10,7±0,7	13,9±1,0
G ₂ /M	20,7±2,2	16,8±1,8	19,5±2,2	17,5±2,0	17,4±1,9	20,0±2,0	20,0±2,2

^a Značajne promene u poređenju sa netretiranom kontrolom

5. DISKUSIJA

Prisustvo višestruke rezistencije na veći broj strukturno i funkcionalno različitih hemioterapeutika, koje se naziva MDR, je bitna karakteristika brojnih malignih tumora. MDR se smatra glavnim uzrokom neuspeha hemioterapije. *In vitro* modeli kao što su rezistentne kancer ćelijske linije selekcionisane kontinuiranim izlaganjem citotoksičnim drogama su neophodne za proučavanje molekularnih mehanizama MDR. Takođe, veoma je značajan njihov doprinos u pronalaženju efikasnijih agenasa za prevazilaženje MDR.

Predmet ispitivanja ove doktorske disertacije je bio efekat kontinuiranog tretmana paklitakselom, prednosti i mane njegove primene kod karcinoma debelog creva i glioblastoma. Kao polazni materijal za istraživanje, korišćene su ćelijske linije karcinoma debelog creva (DLD1) i glioblastoma (U87). Važan doprinos paklitaksela u poboljšanju kvaliteta života i preživljavanja pacijenata obolelih od različitih solidnih maligniteta, posebno je stimulisao istraživanja usmerena ka razjašnjavanju molekularnih mehanizama rezistencije na paklitaksel, kao i razvoj novih agenasa efikasnih u prevazilaženju paklitakselom indukovane rezistencije (Yusuf i saradnici, 2003). I naši eksperimenti, čiji su rezultati ovde prikazani, su upravo osmišljeni da daju doprinos kako razumevanju složenih promena izazvanih izlaganjem paklitakselu, tako i mogućnostima za prevazilaženje njegovih negativnih efekata, prvenstveno razvoja MDR-a.

Iako se paklitaksel trenutno ne koristi za lečenje karcinoma debelog creva i glioblastoma zbog farmakokinetičkih ograničenja, kao što je ekspresija P-glikoproteina u lumenu debelog creva i u krvno-moždanoj barijeri, klinička istraživanja ukazuju da paklitaksel u kombinaciji sa platinskim jedinjenjima postiže obećavajuće rezultate u terapiji karcinoma debelog creva (Fujie i saradnici, 2005), kao i da dopremanje paklitaksela peptidima ili nano-česticama u mozak može poboljšati preživljavanje pacijenata sa tumorima mozga ili moždanim metastazama (Régina i saradnici, 2008; Nikanjam i saradnici, 2007).

5.1. MDR FENOTIP KOD ĆELIJSKIH LINIJA SELEKCIONISANIH PAKLITAKSELOM

DLD1 i U87 ćelijske linije izložili smo postepeno rastućim koncentracijama paklitaksela. Ove ćelijske linije smatramo polaznim ili parentalnim - senzitivnim, jer su dobijene od pacijenata koji prethodno nisu primili hemioterapiju. Upoređivanjem odgovora sukcesivno selekcionisanih ćelija na paklitaksel u odnosu na odgovarajuće parentalne ćelije, uočili smo progresivno smanjenje senzitivnosti na paklitaksel, koje je praćeno povećanjem faktora rezistencije. Nakon višemesečnog selekcionisanja tj. određenog broja ciklusa izlaganja paklitakselu, dobili smo nove ćelijske linije značajno rezistentne na paklitaksel i one su označene kao DLD1-TxR i U87-TxR. Za ove rezistentne ćelije je potrebno upotrebiti koncentraciju paklitaksela i do 100 puta veću u odnosu na parentalnu liniju kako bi se dobio zadovoljavajući efekat i postiglo 50% inhibicije ćelijskog rasta.

Naknadno smo utvrdili da je kontinuirani tretman paklitakselom doveo do razvoja ukrštene rezistencije na poznate hemioterapeutike, koji se strukturno i funkcionalno razlikuju od paklitaksela: vinblastin (inhibitor polimerizacije mikrotubula deobnog vretena), doksorubicin (inhibitor topoizomeraze II, koji dovodi do dvolančanog preloma DNK), epirubicin (inhibitor topoizomeraze II sa blažim sporednim efektima od doksorubicina), etoposid (inhibitor topoizomeraze II) i cisplatin (umeće se u lanac DNK i pravi jednolančane prekide).

Iako MDR fenotip dobijen selekcijom rezistentnih ćelija u većini slučajeva ne odražava stanje u *in vivo* uslovima (Di Nicolantonio i saradnici, 2005), za sada razvoj rezistencije *in vitro* predstavlja jedini model za proučavanje mehanizama rezistencije i načina za njeno prevazilaženje. Naime, smatra se da *in vitro* modeli razvijeni sa ćelijama različitog tkivnog porekla po svojim karakteristikama više nalikuju jedan drugome nego izvornom malignom fenotipu (Gillet i saradnici, 2011). Ova primedba se pre svega zasniva na činjenici da rezistentne ćelije u kulturi u većini slučajeva eksprimiraju neki od MDR transportera, koji kao široko-supstratna efluksna pumpa efikasno eliminiše različite hemioterapeutike. Tako, kao i u slučaju drugih hemioterapeutika, kontinuirana primena paklitaksela najčešće dovodi do pokretanja

klasičnih mehanizama rezistencije, odnosno povećanja ekspresije MDR transportnih pumpi, od kojih je najčešće prisutan i prekomerno eksprimiran P-glikoprotein.

U nameri da utvrdimo doprinos P-glikoproteina u razvoju rezistencije kod DLD1-TxR i U87-TxR ćelija, analizirali smo njegovu ekspresiju na nivou iRNK (kodirajući gen je *mdr1*), na nivou proteina, kao i njegovu funkcionalnost posredstvom nivoa akumulacije njegovih supstrata rodamina 123 i doksorubicina.

Pokazali smo da DLD1-TxR i U87-TxR ćelije imaju ekspresiju *mdr1* iRNK, koja veoma prevazilazi ekspresiju kod odgovarajućih parentalnih ćelija. Štaviše, nivo *mdr1* iRNK ekspresije kod U87 ćelija nije detektabilan, dok je kod U87-TxR ćelija izrazito uočljiv. Rezultati na nivou iRNK potvrđeni su i na nivou ekspresije samog P-glikoproteina, a daleko niži nivo akumulacije rodamina 123 i doksorubicina u rezistentnim ćelijama u odnosu na parentalne, potvrdio nam je visoku aktivnost eksprimiranog P-glikoproteina. Primenom R+verapamila uspeli smo da inhibiramo P-glikoprotein i povratimo akumulaciju rodamina 123 i doksorubicina kod rezistentnih linija. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima, koji ukazuju na pozitivnu korelaciju između ekspresije P-glikoproteina i *in vitro* izlaganja paklitakselu (Takeda i saradnici, 2007; Hembruff i saradnici, 2008). Prekomerna ekspresija P-glikoproteina kod različitih tipova tumora se smatra negativnim prognostičkim markerom i stoji u negativnoj korelaciji sa preživljavanjem pacijenata, kao i sa njihovim odgovorom na terapiju paklitakselom (Yeh i saradnici, 2003; Penson i saradnici, 2004).

P-glikoprotein se može smatrati odgovornim za razvoj MDR fenotipa kod DLD1-TxR ćelija jer je njihov stepen ukrštene rezistencije na vinblastin, doksorubicin, epirubicin i etoposid veom visok, a svi ovi lekovi su supstrati za P-glikoprotein (Takeda i saradnici, 2007; Pesic i saradnici, 2006). Iako U87-TxR ćelije imaju aktivan P-glikoprotein, značajan stepen ukrštene rezistencije su pokazale samo na vinblastin (inhibitor polimerizacije mikrotubula), što ukazuje ili na promenu afiniteta njihovog P-glikoproteina prema supstratima, ili da izvesne promene u vezujućim mestima na tubulinu dodatno pospešuju rezistenciju na mikrotubule-interagujuće agense, kao što su paklitaksel i vinblastin (Glynn i saradnici, 2004).

5.2. UTICAJ PAKLITAKSELA NA DETOKSIFIKACIONI SISTEM

Nakon MDR transportnih pumpi, koje predstavljaju prvu liniju odbrane ćelija od izlaganja ksenobioticima, glavni akter druge linije ćelijske odbrane je glutationski detoksifikacioni sistem. Njegova uloga u razvoju rezistencije na hemioterapeutike je dokumentovana u brojnim studijama (Bredel, 2001). Mi smo na našim modelima analizirali komponente glutationskog sistema odgovorne za razvoj rezistencije (nivo unutarćelijskog glutatona, ekspresiju glutathion-S-transferaze i MRP1 eksportne pumpe glutationskih konjugata na nivou iRNK). DLD1-TxR i DLD1 ćelije se ne razlikuju u ekspresiji *gst- π* iRNK i koncentraciji glutatona, dok je kod U87-TxR ćelija razvoj MDR-a izazvao značajno smanjenje kako *gst- π* iRNK, tako i koncentracije glutatona. Zanimljivo je da je nivo ekspresije *mrp1* iRNK niži kod rezistentnih ćelija u odnosu na odgovarajuće parentalne ćelije. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Yan i saradnika (2007) koji su pokazali da stečena rezistencija na paklitaksel može dovesti do smanjenja ekspresije *gst- π* i *mrp1*.

Iako je kontinuirani tretman paklitakselom doveo do razvoja MDR-a, naši rezultati ukazuju da opisane promene u glutationskom sistemu ne doprinose MDR fenotipu, već mogu biti jedan od pozitivnih aspekata primene paklitaksela. Naime, paklitaksel ima inhibitorni efekat na komponente glutationskog detoksifikacionog sistema uključene u eliminaciju jedinjenja platine. Poznato je i da je aktivnost glutationskog sistema odgovorana za razvoj rezistencije na cisplatin (Yang i saradnici, 2006). Shodno tome, naši rezultati ukazuju da bi nakon razvoja rezistencije na paklitaksel bilo uputno izvršiti tretman nekim platinskim jedinjenjem. Smanjujući potencijal glutationskog sistema za detoksifikaciju, pretretman paklitakselom ustvari može obezbediti veću efikasnost platinskim jedinjenjima. U prilog tome, pokazali smo da kod obe rezistentne linije postoji slaba ukrštena rezistencija na cisplatin, pa kombinacija paklitaksela i jedinjenja platine može biti korisna u terapiji karcinoma debelog creva i glioblastoma. Kod drugih tipova kancera, kliničke studije su već pokazale efikasnost kombinacije paklitaksela i oksaliplatine (Faivre i saradnici, 1999; Winegarden i saradnici, 2004).

5.3. UTICAJ PAKLITAKSELA NA PROCES TUMORSKE ANGIOGENEZE

VEGF zajedno sa svojim receptorima posredstvom autokrinih i parakrinih mehanizama utiče kako na tumorske, tako i na endotelijalne ćelije solidnih tumora (Wu i saradnici, 2007). Zbog toga je povećana ekspresija VEGF-a u tumorima povezana sa lošijom prognozom i nastankom metastaza (Hoeben i saradnici, 2004). Inhibitorski efekat PTX-a na ekspresiju *veg*f iRNK i sekreciju VEGF-a je uočen u *in vitro* uslovima (Toiyama i saradnici, 2009), a istraživanja na solidnim tumorima su potvrdila da PTX može da inhibira VEGF (Loo i saradnici, 2005). Takođe je poznato da se paklitaksel primenjuje u tzv. metronomskoj terapiji, koja ima za cilj da čestom primenom hemioterapeutika u nižim dozama spreči nastanak tumorske vaskulature, rasejavanje ćelija i metastaze (Browder i saradnici, 2000; Klement i saradnici, 2002).

U nameri da utvrdimo da li paklitaksel na našim modelima ima potencijal za inhibiciju tumorske angiogeneze, analizirali smo ekspresiju *veg*f iRNK i sekreciju VEGF-a kod parentalnih i rezistentnih linija nakon jednokratnog tretmana paklitakselom. Takođe smo utvrdili i razlike između parentalnih i rezistentnih linija tj. efekat kontinuiranog izlaganja paklitkselu na ekspresiju i sekreciju VEGF-a. Analizom ekspresije 4 različite forme *veg*f iRNK (*veg*f121, 165, 182 i 210) utvrdili smo da je kod parentalnih i rezistentnih linija najzastupljenija *veg*f165 iRNK. VEGF165 forma je inače okarakterisana kao najpotentniji induktor tumorske angiogeneze (Levy i saradnici, 1995), pa smo shodno tome i analizirali sekreciju baš ovog faktora rasta. Dobijeni rezultati ukazuju da paklitaksel inhibira sekreciju VEGF-a u našim modelima. Ovaj efekat paklitaksel je ostvario u jednokratnom tretmanu DLD1 i DLD1-TxR ćelija, dok je kontinuirani tretman U87 ćelija proizveo značajno smanjenje sekrecije VEGF-a kod rezistentnih U87-TxR ćelija. Štaviše, ekspresija *veg*f165 iRNK kod U87-TxR ćelija je niža u odnosu na ekspresiju kod U87 ćelija. Tako naši rezultati ukazuju da paklitaksel ima anti-angiogeni potencijal koji se ogleda u sprečavanju tumorskih ćelija da proizvode VEGF i tako stimulišu i organizuju endotelijalne ćelije u nove tumorske krvne sudove. Ovaj potencijal, paklitaksel izgleda zadržava i u prisustvu MDR-a.

5.4. UTICAJ PAKLITAKSELA NA ĆELIJSKI CIKLUS

Zbog svog specifičnog efekta na stabilizaciju deobnog vretena, paklitaksel zaustavlja prolazak kroz ćelijski ciklus u G2/M fazi ne dozvoljavajući ćeliji da završi proces deobe. Naša analiza distribucije ćelijskog ciklusa je pokazala da se veliki procenat parentalnih i rezistentnih ćelija karcinoma debelog creva nalazi u S fazi ćelijskog ciklusa i nakon 96 h kultivacije, što ukazuje na njihov snažan proliferativni potencijal. Osim toga, obe ćelijske linije nisu formirale G2/M fazu. Jednokratni tretman DLD1 i DLD1-TxR ćelija paklitakselom je praćen porastom subG0 faze, odnosno povećanjem procenta mrtvih ćelija. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodni nalazima da tretman paklitakselom izaziva apoptozu kod DLD1 ćelija (Fujie i saradnici, 2005).

Ćelije parentalnih i rezistentnih glioblastoma se nakupljaju u G1 fazi ćelijskog ciklusa, što ukazuje na njihov relativno usporen rast. Nakon jednokratnog tretmana U87 ćelija paklitakselom, u potpunosti nestaju razlike između faza ćelijskog ciklusa. Ovaj fenomen je poznat kao „proklizavanje“ u ćelijskoj deobi (engl. „mitotic slippage“) ili adaptacija, kada ćelije završavaju deobu bez anafaze i telofaze, pri čemu nastaju tetraploidne (4N) ćelije kod kojih nije došlo do razdvajanja hromozoma. Kao posledica izlaska iz mitoze, adaptirane ćelije mogu da uđu u apoptozu u G1 fazi ćelijskog ciklusa ili da izbegnu kontrolni sistem G1 faze ćelijskog ciklusa, što dovodi do apoptoze u S i G2 fazi ćelijskog ciklusa (McGrogan i saradnici, 2008). Pošto su U87 ćelije prošle kroz više ciklusa tretmana paklitakselom u kojima je dolazilo do „proklizavanja“ i nepravilne segregacije hromozoma, pretpostavili smo da novonastala U87-TxR ćelijska linija mora biti kariotipski izmenjena, što smo kasnije i pokazali citogenetskom analizom. Kod rezistentnih U87-TxR ćelija, jednokratni tretman paklitakselom ne dovodi više do dramatičnih promena i praćen je samo smanjenjem G1 faze.

5.5. MOLEKULARNO – I CITO-GENETSKE PROMENE INDUKOVANE RAZVOJEM REZISTENCIJE

Obzirom da je inaktivacija p53 i PTEN-a u razvoju rezistencije na hemioterapeutike dobro poznata (Ferreira i saradnici, 1999; McCubrey i saradnici, 2006), odlučili smo da ispitamo da li razvoj MDR fenotipa dovodi do genetskih promena, koje „utišavaju“ ove tumor supresore. I zaista, analiza gubitka heterozigotnosti (LOH) je pokazala inaktivaciju p53 kod U87-TxR ćelija, a inaktivaciju PTEN-a kod DLD1-TxR ćelija. Udeo ovih promena u razvoju rezistencije svakako nije zanemarljiv. Uzimajući u obzir da MDR ćelije pokazuju izvestan stepen ukrštene rezistencije na cisplatin, što se ne može objasniti povišenom ekspresijom P-glikoproteina jer cisplatin nije supstrat ove pumpe, razumno je pretpostaviti da inaktivirani p53 i PTEN doprinose rezistenciji na apoptozu i na taj način smanjuju efikasnost cisplatina.

Citogenetska analiza je pokazala da su MDR ćelije uglavnom zadržale kariotipske karakteristike njima odgovarajućih parentalnih ćelija, ali su i stekle neke nove strukturne i/ili numeričke aberacije. Kontinuirani tretman paklitakselom je doveo do gubitka genetskog materijala na hromozomu 6q kod obe MDR ćelijske linije. Ćelijska linija muškog porekla (DLD1-TxR) je pokazala gubitak genetskog materijala Y hromozoma. Zbog toga pretpostavljamo da hromozomski region 6q i Y hromozom mogu da sadrže važne gene čiji gubitak dovodi do razvoja MDR-a. Međutim, prethodna istraživanja su pokazala da iako je delecija 6q hromozoma povezana sa lošijom prognozom, ona ne dovodi do razvoja rezistencije kod pacijenata sa akutnom limfoblastnom leukemijom (Mancini i saradnici, 2006). Zato naši rezultati dobijeni na ćelijama solidnih maligniteta možda ukazuju na razlike u nastanku MDR-a između hematoloških i solidnih tumora.

Sticanje MDR fenotipa kod U87-TxR ćelija je praćeno smanjenjem jednog nivoa ploidije, pa su kariotipovi većine ćelije diploidni za razliku od izvorne ćelijske linije U87, koja je triploidna. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima objavljenim u radu Tagze i saradnika (2012), koji su pokazali da sticanje rezistencije na paklitaksel dovodi do smanjenja broja hromozoma kod MDA-MB-231 ćelijske linije karcinoma dojke.

Takođe, smanjenje ploidije kod U87-TxR potvrđuje našu pretpostavku izvedenu nakon analize ćelijskog ciklusa u poglavlju 5.4.

U radu Erenpreisa i Cragg (2010) je predloženo da kancer stem ćelije nastaju nakon ekstremnog genotoksičnog stresa, kao što je tretman uobičajenim anti-kancer agensima i može biti povezana sa procesom smanjenja poliploidije koje se naziva neoza. Neoza se definiše kao paraseksualna, somatska redukciona deoba koja se karakteriše:

- 1) senescencijom/mitotskom krizom i poliploidizacijom indukovanom oštećenjem DNK,
- 2) koje je praćeno nastankom aneuoploidnih kćerki ćelija pupljenjem jedra,
- 3) nesimetričnom citokinezom što dovodi do sticanja produženog, ali ograničenog životnog veka potomaka i
- 4) ponavljanjem ovog procesa nekoliko puta za vreme rasta tumora.

Teorija neoze tako može da objasni razvoj rezistencije na hemioterapeutike koji se u kliničkoj praksi primenjuju kontinuirano u ciklusima (Sabisz i Skladanowski, 2009).

5.6. VALIDACIJA NOVIH MDR MODELA

Za validaciju naših MDR modela i specifičnih promena koje su pretrpele rezistentne u odnosu na izvorne tj. parentalne ćelije, koristili smo supstance koje inhibiraju PI3K/Akt i MAPK signalne puteve, kao i supstance koje inhibiraju P-glikoprotein. Na ovaj način proverili smo svrsishodnost naših MDR modela u ispitivanju novih anti-kancer agenasa. Uporedili smo efekat Akt inhibitora - GSK690693, Ras inhibitora - tipifarniba i inhibitora P-glikoproteina – dva prirodna jatrofanska diterpenoida eufodendrofana H i S (Euph H i S) na inhibiciju rasta senzitivnih i rezistentnih ćelija. Takođe smo ispitali njihov potencijal za prevazilaženje MDR-a i senzitivisanje kancer ćelija na dejstvo paklitaksela.

Inhibitorni efekat testiranih supstanci na rast ćelijskih linija razlikovao se kako u odnosu na prisustvo MDR fenotipa, tako i u odnosu na tip kancera (karcinom debelog creva ili glioblastom). Najbolji i najujednačeniji efekat kod svih ćelijskih linija je dobijen primenom Ras inhibitora. Štaviše, senzitivnost na tipifarnib je bila ista kod parentalnih i rezistentnih ćelija. Iz ovih rezultata proizilazi da tipifarnib nije supstrat za P-glikoprotein. Dužina primenjenog tretmana (72 h) je dovoljna da bi se pokazale razlike u osetljivosti ćelija na anti-kancer agense.

S druge strane, prisustvo MDR fenotipa smanjilo je efikasnost Akt inhibitora, pa tako GSK690693 kod DLD1-TxR ćelija ostvaruje slabiji efekat u odnosu na odgovarajuće parentalne ćelije. Za razliku od ćelijskih linija karcinoma debelog creva, GSK690693 je imao sličan efekat na inhibiciju ćelijskog rasta kod senzitivnih i rezistentnih glioblastoma. Pošto prisustvo MDR fenotipa kod glioblastoma ne umanjuje efekat GSK690693, zaključili smo da GSK690693 ne može biti supstrat za P-glikoprotein, pa tako relativnoj rezistenciji na GSK690693 kod DLD1-TxR ćelija isključivo doprinosi inaktivirani PTEN. Naime, inaktivacijom PTEN tumor supresora, negativna regulacija Akt-a je sprečena i može se očekivati povećana ekspresija fosforilisanog Akt-a kod DLD1-TxR, što uslovljava upotrebu viših koncentracija GSK690693 da bi se ovaj signalni put, koji favorizuje preživljavanje ćelija, inhibirao.

Jatrofanski diterpenoidi (Euph H i S) su pokazali značajno slabiji inhibitorni efekat kod svih testiranih ćelijskih linija sa IC_{50} vrednostima iznad 50 μ M. Međutim, prisustvo MDR fenotipa nije dodatno oslabilo efekat jatrofana, što ukazuje da ove prirodne supstance nisu supstrati za P-glikoprotein.

5.7. POVEĆANJE OSETLJIVOSTI NA PAKLITAKSEL

Terapija tumora kombinacijom hemioterapeutika ima za cilj povećanje efikasnosti ispitivanih droga, prevazilaženje problema rezistencije i smanjenje neželjenih efekata. Iako se terapija kombinacijama sa 2 ili više hemioterapeutika primenjuje skoro 50 godina, još uvek postoji potreba za pronalaženjem novih kombinacija, koje bi bile efikasnije i sigurnije za pacijente (Boik & Newman, 2008). Kombinovano dejstvo GSK690693 sa paklitakselom, kao i tipifarniba sa paklitakselom nije ranije ispitivano. Prethodna istraživanja su pokazala da primena inhibitora PI3K/Akt signalnog puta, kao što je LY294002, u kombinaciji značajno povećava efikasnost paklitaksela u tretmanu tumorskih ćelija (Hu i saradnici, 2002). Takođe, inhibicija MEK kinaze, koju aktivira Ras, značajno povećava paklitakselom indukovanu ćelijsku smrt (MacKeigan i saradnici, 2000).

Zbog svega navedenog, odlučili smo da ispitamo efekte istovremenog kombinovanog tretmana tj. da li GSK690693 i tipifarnib mogu poboljšati efikasnost paklitaksela u našim MDR modelima kada se upotrebe u kombinaciji sa paklitakselom. Da bi opravdali poboljšanje efikasnosti paklitaksela dodavanjem još jednog agensa, tretmani su vršeni relativno niskim koncentracijama GSK690693 i tipifarniba. Rezultati su pokazali da kombinacije GSK690693 i paklitaksela, kao i tipifarniba i paklitaksela imaju sinergističko dejstvo. Da bi upotpunili sliku o efektu ispitanih kombinacija na povećanje osetljivosti MDR ćelijskih linija na paklitaksel, rezultate dobijene primenom GSK690693 i tipifarniba u kombinaciji sa paklitakselom, uporedili smo sa samostalnim efektom paklitaksela. Izračunavanjem koeficijenta „relativna reverzija”, utvrđeno je da tipifarnib u istovremenom tretmanu sa paklitakselom obara IC_{50} vrednost za paklitaksel tj. povećava osetljivost na paklitaksel kod DLD-TxR ćelija čak 43 puta. Iako smo uočili sinergizam između GSK690693 i paklitaksela kod obe rezistentne ćelijske linije, GSK690693 je revertovao rezistenciju na paklitaksel kod obe MDR linije svega 2 puta. Zanimljivo je da je efikasnost tarikvidara na reverziju rezistencije kod U87-TxR ćelija bila značajno niža i iznosila 9 puta.

Na osnovu dobijenih rezultata nameće se zaključak o racionalnijoj primeni inhibitora MAPK signalnog puta u kombinaciji sa paklitakselom u odnosu na kombinaciju sa inhibitorom PI3K/Akt signalnog puta. Međutim, literaturni podaci ukazuju na to da pored inhibicije Ras-a, tipifarnib inhibira i P-glikoprotein (Medeiros i

saradnici, 2007), što dodatno doprinosi njegovoj efikasnosti u ponovnom uspostavljanju osetljivosti na paklitaksel.

Jatrofani izolovani iz roda *Euphorbia* predstavljaju novu klasu snažnih inhibitora P-glikoproteina (Corea i saradnici, 2003). Shodno tome, uporedili smo inhibitorni efekat jatrofana Euph H i S na aktivnost P-glikoproteina sa efektom poznatih inhibitora R+verapamila i tarikvidara. Najveći stepen inhibicije uočen je kod DLD1-TxR ćelija nakon tretmana jatrofanom Euph H. Euph S je takođe bio efikasan kod DLD1-TxR ćelija, pokazujući snažniji potencijal od R+verapamila. Za razliku od DLD1-TxR ćelija gde se efekti testiranih inhibitora P-glikoproteina vidno razlikuju, sva četiri jedinjenja su pokazala sličan potencijal kod U87-TxR ćelija.

Iako je Euph H imao najjači efekat na akumulaciju rodamina 123 tj. na suzbijanje aktivnosti P-glikoproteina kod DLD1-TxR ćelija, njegov potencijal za reverziju rezistencije u istovremenom tretmanu sa paklitakselom je bio skoro 2,5 puta niži u odnosu na tarikvidar, a uporediv sa potencijalom R+verapamila. Poznato je da tarikvidar zadržava svoj inhibitorni efekat na ATP-aznu aktivnost P-glikoproteina i do 48 h (Fox i Bates, 2007), pa je moguće da iako Euph H inicijalno poseduje snažniji efekat, ovaj efekat slabi u toku produženog tretmana, dok inhibicija tarikvidarom opstaje.

Snažniji efekat Euph H, kako na inhibiciju P-glikoproteina, tako i na reverziju rezistencije, u donosu na Euph S može se pripisati malim strukturnim razlikama između ova dva jatrofana. Naime, Euph H pripada grupi *egzo*-jatrofana sa 6,17-*egzo* dvostrukom vezom, dok je Euph S *endo*-jatrofan sa 5,6-*endo* dvostrukom vezom. Mada su *endo*-jatrofani polarnija jedinjenja, istraživanja su pokazala da polarnost nema značajnu ulogu u aktivnosti ovih jedinjenja, već da prisustvo OBz grupe na C-8 ili C-9 na srednjem prstenu povećava aktivnost bilo *egzo*-, bilo *endo*-jatrofana (Jadranin i saradnici, 2013). Ova dva jatrofana su upravo zbog pomenutih karakteristika i činjenice da su u odnosu na druge *egzo*- tj. *endo*-jatrofane imali najjaču aktivnost i izabrani za validaciju naših MDR modela.

Poznato je da prisustvo sinonimnih pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (SNP) u *mdr1* genu može menjati afinitet P-glikoproteina za određene supstrate i inhibitore (Kimchi-Sarfaty i saradnici, 2007). Zato smo testirali naše ćelijske linije na prisustvo sinonimne mutacije na poziciji 3435C>T u *mdr1* genu, koja je najčešće povezana sa izmenjenim afinitetom P-glikoproteina. I zaista, utvrdili smo prisustvo ove mutacije kod U87 i U87-TxR ćelija. Pretpostavljamo da ova sinonimna mutacija može

biti razlog za ujednačeno dejstvo svih inhibitora P-glikoproteina kod U87-TxR, kako na aktivnost transportera, tako i na modulaciju rezistencije na paklitaksel.

Efekat kombinovanih tretmana oba jatrofana sa paklitakselom pratili smo i na nivou ćelijskog ciklusa. Prethodna istraživanja su pokazala da jatrofani mogu stimulisati polimerizaciju tubulina, ali da za razliku od paklitaksela ne stabilizuju mikrotubule i ne zaustavljaju ćelijski ciklus u G2/M fazi (Miglietta i saradnici, 2003). Primenom niskih koncentracija Euph H i S u kombinaciji sa niskim tj. neefikasnim koncentracijama paklitaksela dobili smo velike promene u distribuciji ćelijskog ciklusa kod obe rezistentne linije. Efekat kombinacija kod DLD1-TxR i U87-TxR ćelija doveo je do potiranja granica među fazama ćelijskog ciklusa i do značajnog porasta broja mrtvih ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima sprovedenim takođe na MDR ćelijskoj liniji (Pešić i saradnici, 2011), gde je pokazan značajan efekat jatrofana u kombinaciji sa paklitakselom na distribuciju ćelijskog ciklusa, koji je praćen porastom broja ćelija u kasnoj apoptozi.

6. ZAKLJUČCI

- *Kontinuirani tretman rastućim koncentracijama paklitaksela doveo je do razvoja rezistencije kod obe ispitivane ćelijske linije DLD1 (karcinom debelog creva) i U87 (glioblastom).*
- *Novouspostavljene rezistentne ćelijske linije DLD1-TxR i U87-TxR, selekcionisane paklitakselom, pokazale su ukrštenu rezistenciju i na vinblastin, doksorubicin, epirubicin, etoposid i cisplatin, što ukazuje na postojanje MDR fenotipa.*
- *Visok nivo ekspresije *mdr1* iRNK, samog P-glikoproteina, kao i niska akumulacija njegovih supstrata (rodamin 123 i doksorubicin) ukazuju da je aktivnost prekomerno eksprimiranog P-glikoproteina glavni mehanizam rezistencije izazvane kontinuiranim tretmanom paklitakselom.*
- *Kontinuirani tretman paklitakselom inhibira sve ispitivane komponente glutationskog sistema kod glioblastoma, dok je kod karcinoma debelog creva inhibirana ekspresija *mrp1* iRNK. Inhibicija glutationskog detoksifikacionog sistema se može smatrati pozitivnim efektom paklitaksela, bez obzira na razvoj rezistencije.*
- *Paklitaksel moduliše ekspresiju i sekreciju VEGF-a kod MDR ćelija, što ukazuje da se njegov anti-angiogeni potencijal ne gubi razvojem rezistencije.*
- *Paklitaksel dovodi do značajnih promena u distribuciji ćelijskog ciklusa kod senzitivnih ćelija (DLD1 i U87), dok je njegov efekat kod rezistentnih linija (DLD1-TxR i U87-TxR) blaži. Promene u ćelijskom ciklusu kod senzitivnih ćelija nakon tretmana paklitakselom najavljuju mogućnost nepravilne segregacije hromozoma tj. promene na kariotipskom nivou.*
- *Citogenetska analiza je pokazala da su MDR ćelije stekle neke nove strukturne i/ili numeričke aberacije. Kontinuirani tretman paklitakselom je doveo do gubitka genomskog materijala na hromozomu 6q kod obe MDR ćelijske linije. Ćelijska linija muškog porekla (DLD1-TxR) je pokazala gubitak genomskog materijala Y hromozoma. Sticanje MDR fenotipa kod U87-TxR ćelija je praćeno smanjenem jednog nivoa ploidije tj. velikim gubitkom hromozoma u odnosu na senzitivnu liniju.*
- *Analiza gubitka heterozigotnosti (LOH) je pokazala inaktivaciju p53 kod U87-TxR ćelija, a inaktivaciju PTEN-a kod DLD1-TxR ćelija.*

- Najveću efikasnost kod svih ispitivanih ćelijskih linija ostvario je tipifarnib (inhibitor Ras-a).
- Kombinacija tipifarniba, kao i GSK690693 (inhibitor Akt-a) sa paklitakselom dovela je do sinergističkog efekta kod MDR ćelijskih linija.
- Prirodni proizvodi (jatrofanski diterpenoidi) su pokazali značajan inhibitorski efekat na aktivnost P-glikoproteina, uporediv sa pozitivnim kontrolama R+verapamilom i tarikevidarom.
- Tipifarnib i jatrofanski diterpenoidi su značajno povećali senzitivnost MDR ćelijskih linija na paklitaksel.
- Prisustvo sinonimnog polimorfizma 3435C>T u *mdr1* genu uticalo je na smanjenu efikasnost inhibitora P-glikoproteina kod U87-TxR ćelija.
- Senzitivizacija na paklitaksel u kombinovanom tretmanu sa jatrofanskim diterpenoidima praćena je značajnim promjenama u distribuciji ćelijskog ciklusa.

Opšti zaključak:

Indukovana rezistencija kod DLD1-TxR i U87-TxR ćelija predstavlja zahvalan eksperimentalni model za proučavanje mehanizama i načina prevazilaženja MDR-a. Iako paklitaksel dovodi do razvoja rezistencije, njegov inhibitorski efekat na detoksifikacioni sistem i tumorsku angiogenezu predstavlja pozitivan aspekt primene paklitaksela čak i u prisustvu MDR fenotipa. Senzitivizacija MDR ćelija na paklitaksel upotrebom inhibitora PI3K/Akt i MAPK signalnih puteva, kao i prirodnih inhibitora P-glikoproteina predstavlja osnovu za nove strategije u hemioterapiji karcinoma debelog creva i glioblastoma.

7. LITERATURA

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007;26:1324–1337.

Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J* 1994;13:1610–1619.

Aljancić IS, Pesić M, Milosavljević SM, Todorović NM, Jadranin M, Milosavljević G, Povrenović D, Banković J, Tanić N, Marković ID, Ruzdijić S, Vajs VE, Tesević VV. Isolation and biological evaluation of jatrophone diterpenoids from *Euphorbia dendroides*. *J Nat Prod* 2011;74:1613–1620.

Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol* 2003;7:647–654.

Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1423–1431.

Altmann KH, Wartmann M, O'Reilly T. Epothilones and related structures--a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470: M79-91.

Altomare DA, Zhang L, Deng J, Di Cristofano A, Klein-Szanto AJ, Kumar R, Testa JR. GSK690693 delays tumor onset and progression in genetically defined mouse models expressing activated Akt. *Clin Cancer Res* 2010;16:486–496.

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361–398.

Andjelkovic T, Pesić M, Banković J, Tanić N, Marković ID, Ruzdijić S. Synergistic effects of the purine analog sulfinosine and curcumin on the multidrug resistant human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R). *Cancer Biol Ther* 2008;7:1024–1032.

Armand JP, Burnett AK, Drach J, Harousseau JL, Löwenberg B, San Miguel J. The emerging role of targeted therapy for hematologic malignancies: update on bortezomib and tipifarnib. *Oncologist* 2007;12:281–290.

Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:199–214.

Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009;19:329–337.

Basso AD, Kirschmeier P, Bishop WR. Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *J Lipid Res* 2006;47:15–31.

Berrieman HK, Lind MJ, Cawkwell L. Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet Oncol* 2004;5:158–164.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432:332–337.

Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18238-18242.

Blagosklonny MV. Mitotic arrest and cell fate. *Cell Cycle* 2007;6:70–74.

Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;6: 611–622.

Boik JC, Newman RA. A classification model to predict synergism/antagonism of cytotoxic mixtures using protein-drug docking scores. *BMC Pharmacol* 2008;8:13.

Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, Paduraru DN. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chirurgia (Bucur)* 2012;107:555-563.

Bosch S, Siavoshian S, Jacquot C, Tomasoni C, Dabouis G, Elanbaloussi Y, Leneel T, More MT, Roussakis C. Correlation between multidrug resistance and the degree of differentiation of non-small-cell bronchopulmonary carcinoma (NSCLC) in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 1997;17:4595-4598.

Botta M, Armaroli S, Castagnolo D, Fontana G, Pera P, Bombardelli E. Synthesis and biological evaluation of new taxoids derived from 2-deacetoxytaxinine. *J Bioorg Med Chem Lett* 2007;17: 1579-1583.

Bouchard C, Marquardt J, Bras A, Medema RH, Eilers M. Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *Embo J* 2004;23:2830-2840.

Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 2005;179:56–65.

Bralten L, French P. Genetic Alterations in Glioma. *Cancers* 2011;3:1129-1140.

Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R, Zhang L, Swanson E, Datta LW, Moran T, Ravenhill G, Duerr RH, Achkar JP, Karban AS, Cho JH. MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2003;73:1282-1292.

Bredel M. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res Rev* 2001;35:161-204.

Breedveld P, Beijnen JH, Schellens JH. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:17-24.

Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60:1878-1886.

Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 2002;156:817-828.

Brunner TB, Hahn SM, Gupta AK, Muschel RJ, McKenna WG, Bernhard EJ. Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations. *Cancer Research* 2003;63:5656–5668.

Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008;8:671-682.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249–257.

Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:18–24.

Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:118–132.

Chadderton T, Wilson C, Bewick M, Gluck S. Evaluation of three rapid RNA extraction reagents: relevance for use in RT-PCR's and measurement of low level gene expression in clinical samples. *Cell Mol Biol* 1997;43:1227-1234.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55.

Cigler T, Vahdat LT. Eribulin mesylate for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11:1587-1593.

Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2002;1:707–717.

Clark EA, Hills PM, Davidson BS, Wender PA, Mooberry SL. Laulimalide and synthetic laulimalide analogues are synergistic with paclitaxel and 2-methoxyestradiol. *Mol Pharm* 2006;3:457-467.

Corea G, Fattorusso E, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O, Appendino G, Ballero M, Simon PN, Dumontet C, Di Pietro A. Jatrophone diterpenes as P-glycoprotein inhibitors. First insights of structure-activity relationships and discovery of a new, powerful lead. *J Med Chem* 2003;46:3395-3402.

Dantzig, AH, de Alwis DP, Burgess M. Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:133-150.

Dearth LR, Qian H, Wang T, Baroni TE, Zeng J, Chen SW, Yi SY, Brachmann RK. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis* 2007;28:289-298.

Deferme S, Gelder JV, Augustijns P. Inhibitory effect of fruit extracts on P-glycoprotein related efflux carriers: an in vitro screening. *J Pharm Pharmacol* 2002;54:1213-1219.

Derry WB, Wilson L, Jordan MA. Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* 1995;34:2203-2211.

Desai TK, Barkel D. Syndromic colon cancer: lynch syndrome and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Clin North Am* 2008;37:47-72.

Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005;24:2909-2915.

Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Knight LA, Gabriel FG, Whitehouse PA, Sharma S, Fernando A, Glaysher S, Di Palma S, Johnson P, Somers SS, Toh S, Higgins B, Lamont A, Gulliford T, Hurren J, Yiangou C, Cree IA. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer* 2005; 5:78-94.

Diaz-Cano SJ. General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology* 2008;53:1-19.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006;7:606-619.

Erenpreisa J, Cragg MS. MOS, aneuploidy and the ploidy cycle of cancer cells. *Oncogene* 2010; 29:5447-5451.

Faivre S, Kalla S, Cvitkovic E, Bourdon O, Hauteville D, Dourte LM, Bensmaïne MA, Itzhaki M, Marty M, Extra JM. Oxaliplatin and paclitaxel combination in patients with platinum-pretreated ovarian carcinoma: an investigator-originated compassionate-use experience. *Ann Oncol* 1999;10:1125-1128.

Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* 1998;16:1743-1748.

Fellner S, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhänel M, Spruss T, Bernhardt G, Graeff C, Färber L, Gschaidmeier H, Buschauer A, Fricker G. Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2002;110:1309-18.

Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G. p53 and chemosensitivity. *Ann Oncol* 1999;10:1011-1021.

Ferreira MJ, Gyémánt N, Madureira AM, Tanaka M, Koós K, Didziapetris R, Molnár J. The effects of jatrophone derivatives on the reversion of MDR1- and MRP-mediated multidrug resistance in the MDA-MB-231 (HTB-26) cell line. *Anticancer Res* 2005;25:4173-4178.

Fox E, Bates SE. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:447-459.

Fujie Y, Yamamoto H, Ngan CY, Takagi A, Hayashi T, Suzuki R, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:453-463.

Fukuyama R, Niculaita R, Ng KP, Obusez E, Sanchez J, Kalady M, Aung PP, Casey G, Sizemore N. Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses beta-catenin-dependent transcription. *Oncogene* 2008;27:6044-6055.

Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 2009;1794:860-871.

Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:385-398.

Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton GM, Reid BJ. Clonal expansion, and loss of heterozygosity at chromosomes 9p, and 17p in premalignant esophageal (Barrett's) tissue. *J Nat Cancer Inst* 1999;91:2087-2095.

Galletti E, Magnani M, Renzulli ML, Botta M. Paclitaxel and docetaxel resistance: molecular mechanisms and development of new generation taxanes. *ChemMedChem* 2007;2:920-942.

Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:313-319.

Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, Patel C, Orina JN, Eliseeva TA, Singal V, Padmanabhan R, Davidson B, Ganapathi R, Sood AK, Rueda BR, Ambudkar SV, Gottesman MM. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:18708-18713.

Glynn SA, Gammell P, Heenan M, O'Connor R, Liang Y, Keenan J, Clynes M. A new superinvasive in vitro phenotype induced by selection of human breast carcinoma cells with the chemotherapeutic drugs paclitaxel and doxorubicin. *Br J Cancer* 2004;91:1800-1807.

Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003;63:1608-1614.

Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000;18:1967-1979.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.

Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:101-128.

Hahn M, Wieland I, Koufaki ON, Görgens H, Sobottka SB, Schackert G, Schackert HK. Genetic Alterations of the Tumor Suppressor Gene PTEN/MMAC1 in Human Brain Metastases. *Clin Cancer Res* 1999;5:2431-2437.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.

Hawkins D, Demers G, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1996;56:892-898.

Hegedus C, Ozvegy-Laczka C, Apáti A, Magócsi M, Németh K, Orfi L, Kéri G, Katona M, Takáts Z, Váradi A, Szakács G, Sarkadi B. Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br J Pharmacol* 2009;158:1153-1164.

Hembruff SL, Laberge ML, Villeneuve DJ, Guo B, Veitch Z, Cecchetto M, Parissenti AM. Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. *BMC Cancer* 2008;8:318.

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:988-1004.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56:549-580.

Honore S, Pasquier E, Braguer D. Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:3039-3056.

Hood KA, West LM, Rouwé B, Northcote PT, Berridge MV, Wakefield SJ, Miller JH. Peloruside A, a novel antimitotic agent with paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity. *Cancer Res* 2002;62:3356-3360.

Hu L, Hofmann J, Lu Y, Mills GB, Jaffe RB. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer Res* 2002; 62:1087-1092.

Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, Huang CM, Gill GN, Wiley HS, Cavenee WK: The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997;272:2927–2935.

Hübner C, Petermann I, Browning BL, Shelling AN, Ferguson LR. Triallelic single nucleotide polymorphisms and genotyping error in genetic epidemiology studies: MDR1 (ABCB1) G2677/T/A as an example. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1185-1192.

Jadranin M, Pešić M, Aljančić IS, Milosavljević SM, Todorović NM, Podolski-Renić A, Banković J, Tanić N, Marković I, Vajs VE, Tešević VV. Jatrophone diterpenoids from the latex of *Euphorbia dendroides* and their anti-P-glycoprotein activity in human multi-drug resistant cancer cell lines. *Phytochemistry* 2013;86:208-217.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277–300.

Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:150-158.

Jiang WQ, Fu FF, Li YX, Wang WB, Wang HH, Jiang HP, Teng LS. Molecular biomarkers of colorectal cancer: prognostic and predictive tools for clinical practice. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012;13:663-675.

Kang MH, Figg WD, Ando Y, Blagosklonny MV, Liewehr D, Fojo T, Bates SE. The P-glycoprotein antagonist PSC 833 increases the plasma concentrations of 6 α -hydroxypaclitaxel, a major metabolite of paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2001;7:1610-1617.

Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, Horwitz SB. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* 1997;100:1282-1293.

Kearns PR, Hall AG. Microtiter plate technique for the measurement of glutathione in fresh and cryopreserved lymphoblasts using the enzyme recycling method. *Methods Mol Med* 1999;28:83-90.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315:525-528.

Klement G, Huang P, Mayer B, Green SK, Man S, Bohlen P, Hicklin D, Kerbel RS. Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2002;8:221-232.

Knobbe CB, Merlo A, Reifemberger G: Pten signaling in gliomas. *Neuro-Oncology* 2002;4:196–211.

Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet* 2002;111:96–102.

Krishna R, Mayer L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11:265-283.

Kumar R, Blakemore SJ, Ellis CE, Petricoin EF 3rd, Pratt D, Macoritto M, Matthews AL, Loureiro JJ, Elliston K. Causal reasoning identifies mechanisms of sensitivity for a novel AKT kinase inhibitor, GSK690693. *BMC Genomics* 2010;11:419.

Lepper ER, Nooter K, Verweij J, Acharya MR, Figg WD, Sparreboom A. Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2. *Pharmacogenomics* 2005;6:115-138.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:216-237.

Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J* 2004;382:1-11.

Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995;27;13333-13340.

Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2003;2:339-345.

Libra M, Malaponte G, Navolanic PM, Gangemi P, Bevelacqua V, Proietti L, Bruni B, Stivala F, Mazzarino MC, Travali S, McCubrey J. Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. *Cell Cycle* 2005;4:1382–1384.

Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;114:143–149.

Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 2001;61:3230-3239.

Long BH, Carboni JM, Wasserman AJ, Cornell LA, Casazza AM, Jensen PR, Lindel T, Fenical W, Fairchild CR. Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Res* 1998;58:1111-1115.

Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005;205:275-292.

Loo WT, Fong JH, Cheung MN, Chow LW. The efficacy of Paclitaxel on solid tumour analysed by ATP bioluminescence assay and VEGF expression: a translational research study. *Biomed Pharmacother* 2005;59:S337-S339.

Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 2006;1:97-117.

Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;432:307–315.

MacKeigan JP, Collins TS, Ting JP. MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:38953-38956.

Mancini M, Vegna ML, Castoldi GL, Mecucci C, Spirito F, Elia L, Tafuri A, Annino L, Pane F, Rege-Cambrin G, Gottardi M, Leoni P, Gallo E, Camera A, Luciano L, Specchia G, Torelli G, Sborgia M, Gabbas A, Tedeschi A, Della Starza I, Cascavilla N, Di Raimondo F, Mandelli F, Foà R. Partial deletions of long arm of chromosome 6: biologic and clinical implications in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2002;16:2055-2061.

Martello LA, LaMarche MJ, He L, Beauchamp TJ, Smith AB, Horwitz SB. The relationship between Taxol and (+)-discodermolide: synthetic analogs and modeling studies. *Chem Biol* 2001;8:843-855.

Martello LA, McDaid HM, Regl DL, Yang CP, Meng D, Pettus TR, Kaufman MD, Arimoto H, Danishefsky SJ, Smith AB 3rd, Horwitz SB. Taxol and discodermolide represent a synergistic drug combination in human carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 2000;6:1978-1987.

Martello LA, Verdier-Pinard P, Shen HJ, He L, Torres K, Orr GA, Horwitz SB. Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a taxol-resistant/dependent A549 cell line with an α -tubulin mutation. *Cancer Res* 2003;63:1207–1213.

Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805:105-117.

McClelland SE, Burrell RA, Swanton C. Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy. *Cell Cycle* 2009;8:3262-3266.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1263-84.

McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008;1785:96-132.

Medeiros BC, Landau HJ, Morrow M, Lockerbie RO, Pitts T, Eckhardt SG. The farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, is a potent inhibitor of the MDR1 gene product, P-glycoprotein, and demonstrates significant cytotoxic synergism against human leukemia cell lines. *Leukemia* 2007;21:739-746.

Miglietta A, Gabriel L, Appendino G, Bocca C. Biological properties of jatrophone polyesters, new microtubule-interacting agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:67-74.

Morris SM. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res* 2002;511:45-62.

Nikanjam M, Gibbs AR, Hunt CA, Budinger TF, Forte TM. Synthetic nano-LDL with paclitaxel oleate as a targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. *J Control Release* 2007;124:163-71.

O'Driscoll L, Daly C, Saleh M, Clynes M. The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology* 1993;12:289-314.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P: Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64:6892–6899.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445-1453.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002;19:607-614.

Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003;22:7280-7295.

Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters* 2006;580:2903–2909.

Pangon L, Sigglekow ND, Larance M, Al-Sohaily S, Mladenova DN, Selinger CI, Musgrove EA, Kohonen-Corish MR. The "Mutated in Colorectal Cancer" Protein Is a Novel Target of the UV-Induced DNA Damage Checkpoint. *Genes Cancer* 2010;1:917-926.

Penegar S, Wood W, Lubbe S, Chandler I, Broderick P, Papaemmanuil E, Sellick G, Gray R, Peto J, Houlston R. National study of colorectal cancer genetics. *Br J Cancer* 2007;97:1305–1309.

Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T. Expression of multidrugresistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynaecol Oncol* 2004;93:98–106.

Pesic M, Markovic JZ, Jankovic D, Kanazir S, Markovic ID, Rakic L, Ruzdijic S. Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line in vitro by anticancer drugs. *J Chemother* 2006;18:66-73.

Pešić M, Banković J, Aljančić IS, Todorović NM, Jadranin M, Vajs VE, Tešević VV, Vučković I, Momčilović M, Marković ID, Tanić N, Ruždijić S. New anti-cancer characteristics of jatrophone diterpenes from *Euphorbia dendroides*. *Food Chem Toxicol* 2011;49:3165-3173.

Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorsel CJ, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Ther* 2000;87:227-253.

Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* 1984;12:1687-1696.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359:235-237.

Power DG, Glogowski E, Lipkin SM. Clinical genetics of hereditary colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010;24:837–859.

Priulla M, Calastretti A, Bruno P, Azzariti A, Paradiso A, Canti G, Nicolin A. Preferential chemosensitization of PTEN-mutated prostate cells by silencing the Akt kinase. *Prostate* 2007; 67:782-789.

Régina A, Demeule M, Ché C, Lavallée I, Poirier J, Gabathuler R, Béliveau R, Castaigne JP. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol* 2008;155:185-97.

Reid BJ, Prevo LJ, Galipeau PC, Sanchez CA, Longton G, Levine DS, Blount PL, Rabinovitch PS. Division Predictors of progression in Barrett's esophagus II: baseline 17p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2839–2848.

Rieder CL, Maiato H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* 2004;7:637–651.

Rivera E, Gomez H. Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone. *Breast Cancer Res* 2010;12 Suppl 2:S2.

Rottmann S, Wang Y, Nasoff M, Deveraux QL, Quon KC. A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15195-15200.

Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, Ayers M, Ross JS, Zhang P, Buchholz TA, Kuerer H, Bgreen M, Arun B, Hortobagyi GN, Symmans WF, Pusztai L. Microtubule associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8315–8320.

Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* 1995;332:1004-1014.

Sabisz M, Skladanowski A. Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells: implications for drug resistance and in vitro drug screening models. *Cell Cycle* 2009;8:3208-3217.

Sadeq V, Isar N, Manoochehr T. Association of sporadic breast cancer with PTEN/MMAC1/TEP1 promoter hypermethylation. *Med Oncol* 2011;28:420-423.

Santucci R, Mackley PA, Sebti S, Alsina M. Farnesyltransferase inhibitors and their role in the treatment of multiple myeloma. *Cancer Control* 2003;10:384-387.

Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol Rev* 2006;86:1179–1236.

Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:253-262.

Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2:494-503.

Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 2003;22:7496-511.

Shen H, Xu W, Luo W, Zhou L, Yong W, Chen F, Wu C, Chen Q, Han X. Upregulation of *mdr1* gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma. *Exp Hematol* 2011;39:558-569.

Shigemori H, Kobayashi J. Biological activity and chemistry of taxoids from the Japanese yew, *Taxus cuspidata*. *J Nat Prod* 2004;67:245-256.

Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264:29-41.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1107-1112.

Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65:95-106.

Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)* 2011;3:192-222.

Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004;18:189–218.

Stephens L, Williams R, Hawkins P. Phosphoinositide 3-kinases as drugtargets in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:357–365.

Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:3589-3595.

Strobel T, Kraeft SK, Chen LB, Cannistra SA. BAX expression is associated with enhanced intracellular accumulation of paclitaxel: a novel role for BAX during chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 1998;58:4776–4781.

Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005;5:198-206.

Takeda M, Mizokami A, Mamiya K, Li YQ, Zhang J, Keller ET, Namiki M. The establishment of two paclitaxel-resistant prostate cancer cell lines and the mechanisms of paclitaxel resistance with two cell lines. *Prostate* 2007;67:955-67.

Tegze B, Szállási Z, Haltrich I, Pénczvártó Z, Tóth Z, Likó I, Györffy B. Parallel evolution under chemotherapy pressure in 29 breast cancer cell lines results in dissimilar mechanisms of resistance. *PLoS One* 2012;7:e30804.

Teng DH, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, Swedlund B, Hansen KL, Vinson VL, Gumpfer KL, Ellis L, El-Naggar A, Frazier M, Jasser S, Langford LA, Lee J, Mills GB, Pershouse MA, Pollack RE, Tornos C, Troncso P, Yung WK, Fujii G, Berson A, Steck PA, et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:5221-5225.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Na Rev Cancer* 2002;2: 442–454.

Tiwari AK, Sodani K, Wang SR, Kuang YH, Ashby CR Jr, Chen X, Chen ZS. Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochem Pharmacol* 2009;78:153-161.

Toiyama Y, Inoue Y, Hiro J, Ojima E, Watanabe H, Narita Y, Okigami M, Hosono A, Miki C, Kusunoki M. Paclitaxel inhibits radiation induced VEGF secretion and enhances radiosensitizing effects in human colon cancer cell HT29. *Cancer Ther* 2009;7:123-132.

Toiyama Y, Inoue Y, Hiro J, Ojima E, Watanabe H, Narita Y, Okigami M, Hosono A, Miki C, Kusunoki M. Paclitaxel inhibits radiation induced VEGF secretion and enhances radiosensitizing effects in human colon cancer cell HT29. *Cancer Ther* 2009;7:123-132.

Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003;22:7369-7375.

van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006;24:2715-2722.

van Oijen MG, Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin Cancer Res* 2000;6:2138-2145.

Varma M, Ashokraj Y, Dey CS, Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* 2003;48:347-359.

Vasas A, Sulyok E, Rédei D, Forgo P, Szabó P, Zupkó I, Berényi Á, Molnár J, Hohmann J. Jatrophone diterpenes from *Euphorbia esula* as antiproliferative agents and potent chemosensitizers to overcome multidrug resistance. *J Nat Prod* 2011;74:1453-1461.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789-799.

Wagner P, Wang B, Clark E, Lee H, Rouzier R, Pusztai L, Microtubule associated protein (MAP)-tau a novel mediator of paclitaxel in vitro and in vivo. *Cell Cycle* 2005;4:1149–1152.

Wang TH, Wang HS, Ichijo H. Microtubule-interfering agents activate c-Jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating pathways *J Biol Chem* 1998;273:4928–4936.

Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000;88:2619–2628.

Wang Y, O'Brate A, Zhou W, Giannakakou P. Resistance to microtubule-stabilizing drugs involves two events, beta-tubulin mutation in one allele followed by loss of the second allele *Cell Cycle* 2005;4:1847–1853.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-2327.

Wartmann M, Altmann KH. The biology and medicinal chemistry of epothilones. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002;2:123-148.

Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 1997;3:523–530.

Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaption, and cell death. *Cancer Cell* 2005;8:7–12.

Wei EK, Colditz GA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Rosner BA. Cumulative risk of colon cancer up to age 70 years by risk factor status using data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 2009;170:863–872.

Westphal JR, Van't Hullenaar R, Peek R, Willems RW, Crickard K, Crickard U, Askaa J, Clemmensen I, Ruiter DJ, De Waal RM. Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo. *Int J Cancer* 2000;86:768-776.

Winegarden JD, Mauer AM, Otterson GA, Rudin CM, Villalona-Calero MA, Lanzotti VJ, Szeto L, Kasza K, Hoffman PC, Vokes EE. A phase II study of oxaliplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:915–920.

Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 2010;25:85–101.

Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, Rak J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* 2001;3:371-384.

Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT. Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the “primer-dropping” method. *Anal Biochem* 1994;223:251-258.

Wu W, Onn A, Isobe T, Itasaka S, Langley RR, Shitani T, Shibuya K, Komaki R, Ryan AJ, Fidler IJ, Herbst RS, O'Reilly MS. Targeted therapy of orthotopic human lung cancer by combined vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor signaling blockade. *Mol Cancer Ther* 2007;6:471-483.

Xu R, Sato N, Yanai K, Akiyoshi T, Nagai S, Wada J, Koga K, Mibu R, Nakamura M, Katano M. Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer Res* 2009;29:261-270.

Yan XD, Li M, Yuan Y, Mao N, Pan LY. Biological comparison of ovarian cancer resistant cell lines to cisplatin and Taxol by two different administrations. *Oncol Rep* 2007;17:1163-1169.

Yang P, Ebbert JO, Sun Z, Weinshilboum RM. Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. *J Clin Oncol* 2006;24:1761-1769.

Yeh JJ, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with P-glycoprotein expression. *Respiration* 2003;70:32–35.

Yusuf RZ, Duan Z, Lamendola DE, Penson RT, Seiden MV. Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3:1-19.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-XL. *Cell* 1996;87:589–592.

Zhang CC, Yang JM, White E, Murphy M, Levine A, Hait WN. The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells. *Oncogene* 1998;16:1617–1624.

Zheng LS, Wang F, Li YH, Zhang X, Chen LM, Liang YJ, Dai CL, Yan YY, Tao LY, Mi YJ, Yang AK, To KK, Fu LW. Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function. *PLoS One* 2009;4:e5172.

Zhou S, Lim LY, Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 2004;36: 57-104.

Zhou SF, Zhou ZW, Li CG, Chen X, Yu X, Xue CC, Herington A. Identification of drugs that interact with herbs in drug development. *Drug Discov Today* 2007;12:664-673.

BIOGRAFIJA

Ana Podolski-Renić je rođena 17.05.1980. godine u Zemunu. Osnovnu i srednju školu završila je u Rumi. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1999. Godine, a diplomirala je 23.11. 2006. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija sa srednjom ocenom 9,03.

Na odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” zaposlena je od 11.06.2007. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije Ane Podolski-Renić urađen je u laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, u okviru naučno-istraživačkih projekata #143009 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj i III41031 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj.

U svom dosadašnjem radu Ana Podolski-Renić je učestvovala sa 5 kongresnih saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja i sa 2 kongresna saopštenja na skupovima domaćeg značaja. Ana Podolski-Renić je autor jednog naučnog rada objavljenog u časopisu međunarodnog značaja i koautor još osam radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja.